Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

53. BAND, 1. HEFT

MIT 73 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 1. DEZEMBER 1960)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1960

Z. Zellforsch.

Preis DM 41.80

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von *R. Goldschmidt* und *W. von Möllendorff*. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von *R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler*. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von *W. von Möllendorff* und *J. Seiler*, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von *Max Schultze*; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von *v. La Valette St. George, W. Waldeyer*; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von *O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer*. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von *W. Roux, H. Braus, H. Spemann*.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma", Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie" weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Heidelberg
Neuenheimer Landstraße 28—30
Fernsprecher 27901

Berlin-Wilmersdorf
Heidelberger Platz 3
Fernsprecher 830301

53. Band **Inhaltsverzeichnis** 1. Heft

Seite

KOBAYASHI, H., and D. S. FARNER, The effect of photoperiodic stimulation on phosphatase activity in the hypothalamo-hypophysial system of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. With 10 Figures in the Text 1

MOERICKE, V., und K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, Zur funktionellen Morphologie der Speicheldrüsen von Homopteren. IV. Mitteilung. Die Ausführgänge der Speicheldrüsen von *Myzus persicae* (SULZ.), *Aphididae*. Mit 12 Textabbildungen 25

DAVID, H., Über einen Nucleolus mit Membran. Mit 3 Textabbildungen 50

STAUBESAND, J., und W. SCHMIDT, Zur Histophysiologie des Herzbeutels. I. Mitteilung. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Deckzellen des Peri- und Epikards. Mit 9 Textabbildungen 55

BARASA, A., Forma, grandezza e densitá dei neuroni della corteccia cerebrale in mammiferi di grandezza corporea differente. Con 11 Figure nel Testo 69

WRBA, H., Vitalitätsbestimmung durch Aufnahme und Umsatz markierter Verbindungen. Mit 28 Textabbildungen 90

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für Zellforschung 53, 1—24 (1960)

Laboratories of Zoophysiology, Department of Zoology, Washington State University, Pullman

THE EFFECT OF PHOTOPERIODIC STIMULATION ON PHOSPHATASE ACTIVITY IN THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSIAL SYSTEM OF THE WHITE-CROWNED SPARROW, *ZONOTRICHIA LEUCOPHRYS GAMBELII* *

By

HIDESHI KOBAYASHI** and DONALD S. FARNER

With 10 Figures in the Text

(Received May 23, 1960)

Introduction

Since the pioneer experiments of ROWAN and BISSONNETTE the photoperiodic timing mechanisms in birds have been the subject of numerous investigations. The rather extensive literature on avian photoperiodism has been reviewed adequately by BENOIT (1950a, b), BENOIT and ASSENMACHER (1953a, b), ASCHOFF (1955), FARNER (1955, 1958, 1959), OKSCHE *et al.*, (1959), and WOLFSON (1959). It is apparent that several annually periodic functions are timed photoperiodically in a number of temperate-zone species. Among these photoperiodically controlled functions are the vernal development of the gonads; the vernal premigratory deposition of fat, including the causal hyperphagia and altered intermediary metabolism; probably the prenuptial molt, and possibly the post nuptial molt.

The thorough morphologic studies of WINGSTRAND (1951) and GRIGNON (1956), the ingenious experiments of BENOIT and his colleagues (see BENOIT and ASSENMACHER, 1953b, 1955, and 1959 for general resumé), and the extensive investigations of H. LEGAIT (1959) have revealed, at least in broad outline, the elements of the photoperiodic control mechanism. These indicate clearly that among the integral parts of the mechanism are hypothalamic neurosecretory cells from the axons of which there appears to be a transfer of a humoral substance in the median eminence into the hypothalamo-hypophysial portal system by which it is transported to the adenohypophysis. The results of investigations in this laboratory (OKSCHE *et al.*, 1959) with White-crowned Sparrows are consistent with this concept. However, it must be emphasized that, although the broad general outline of the photoperiodic control mechanism is apparent, many of the most elemental details of its basic function are still unknown.

The White-crowned Sparrow offers significant advantages in the investigation of the fundamental functional relationships between the hypothalamic neurosecretory system and the adenohypophysis. There is initially the relatively

* These investigations were supported by funds provided for medical and biological research by the State of Washington Initiative Measure No. 171 and by a research grant (B-1353) from the National Institutes of Health. The authors wish to acknowledge the assistance and helpful suggestions of Mr. DONALD F. LAWS in the planning and interpretation of the experiments, and the invaluable technical assistance of Mr. DONALD A. WELLS, Dr. WILLIAM F. BROWN, Miss BETTY JANE JOHNSON, and Mr. T. DONALD FORSYTH. We are especially indebted to Dr. ANDREAS OKSCHE, Anatomisches Institut, Marburg/Lahn for his suggestions and criticisms.

** Zoological Institute, Faculty of Science, Tokyo University, Tokyo.

advantageous morphologic relationship between the neurosecretion-bearing axons of the median eminence (OKSCHE *et al.*, 1959) and the hypophysial portal system. Furthermore there are relatively precise quantitative relations of the duration of the photoperiod (FARNER and WILSON, 1957), intensity of the light (FARNER, unpublished), and wave-length composition of the light (FARNER, unpublished), with the rate of testicular development. Thus, manipulation of the daily photoperiod can serve as a powerful, although simple, experimental tool. Treatment of photosensitive birds[1] with daily photoperiods of sufficient length to stimulate gonadal development is accompanied by a daily depletion of aldehyde-fuchsin-stainable neurosecretory material from the axonic "loops" of the median eminence and a reaccumulation during each dark period (OKSCHE *et al.*, 1959). Refractory birds, in which it is not possible to photostimulate gonadal development, have axonic loops which are densely packed with neurosecretory granules; in these birds the density of the granules is unaffected by long daily photoperiods (LAWS, unpublished).

In the investigations reported here we have attempted to gain some suggestion of the active sites of synthesis and/or active transport in the hypothalamic neurosecretory system by estimation of phosphatase activity in selected parts from photosensitive and refractory birds subjected to both short days (non-stimulatory to photosensitive birds) and long days (stimulatory to photosensitive birds). Another and equally important objective is to explore further the possibility of a quantitative expression of the activity of the hypothalamic neurosecretory system in terms of phosphatase activity (KOBAYASHI and KAMBARA, 1959a, b).

The experimental birds

To have photosensitive (non-refractory) birds available in September and October for simultaneous and comparative experiments with naturally refractory birds, a stock was obtained by means of mist nets in April 1959 from the winter population (MEWALDT and FARNER, 1953) in the Snake River Canyon in southeastern Washington. These birds were then maintained in large outdoor aviaries to allow them to pass through the normal seasonal phase of gonadal activity. To hasten the elimination of the consequent refractory state, they were transferred to cages indoors on 20 July and maintained on 8-hour daily photoperiods, which have been shown to accelerate the elimination of refractoriness (WOLFSON, 1954; FARNER, unpublished), and which also have been shown to be non-stimulatory with respect to the photoperiodic testicular response (FARNER and WILSON, 1957). That these birds were in fact photosensitive, or non-refractory with respect to both testicular and metabolic photoperiodic responses, is evident from Tables 12 and 14. On 14 October 1959 these birds were divided into two groups. One group (SL, *i.e.* "sensitive-long day") was subjected to 20-hour daily photoperiods whereas the second group (SS, *i.e.* "sensitive-short day") was continued on 8-hour daily photoperiods.

Naturally refractory birds were captured with mist nets in September near Pullman, Washington. These were held in an indoor aviary on 13-hour daily photoperiods (approximately natural photoperiods). On 14 October they were divided into two groups. The first group (RL, *i.e.* refractory, long day) was exposed to 20-hour daily photoperiods. The second group (RS, *i.e.* refractory, short day) was continued on 13-hour photoperiods. The apparently

[1] In this paper we are using *photosensitive bird* to mean a bird which responds to long daily photoperiods by gonadal development, fat deposition, and other typical photoperiodic responses. On the other hand, a *refractory bird* is one which does not show these responses on being subjected to long daily photoperiods. A *refractory period* typically follows each photoperiodically stimulated gonadal cycle. For descriptions of refractoriness in *Zonotrichia leucophrys gambelii* see MILLER (1954), FARNER and MEWALDT (1955), and FARNER (1959).

comparable experimental procedure of placing this group on 8-hour photoperiod was considered inadvisable since this would have caused an accelerated recovery from refractory state.

The caging, feeding, and lighting procedures were as described by FARNER and WILSON (1957).

General methods

Refractory (group RL) and photosensitive (group SL) birds, exposed to 20-hour daily photoperiods, were killed by decapitation at intervals of 6—7 days for estimates of phosphatase activity at selected sites in the hypothalamo-hypophysial system. Similar estimates of phosphatase activity were made for refractory birds on 13-hour photoperiods (group RS) and photosensitive birds on 8-hour photoperiods (group SS) at the beginning and at the end of the experiment.

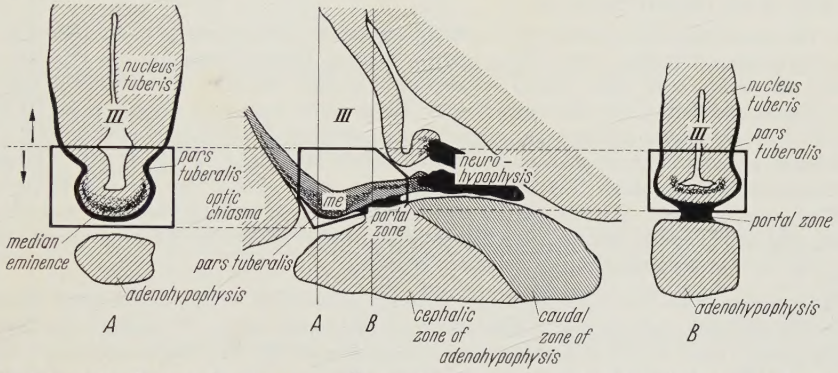


Fig. 1. Schematic diagram showing the median-eminence sample used in the estimation of phosphatase activity. *A* and *B* are cross sections through the median eminence in the planes indicated in the central longitudinal section. The sample is enclosed by the heavy straight black lines. The arrows at the left indicate the variation in the level at which the incisions were made. *III*, third ventricle; *me*, median eminence

Phosphatase activity was estimated by a procedure essentially the same as the method of OHMORI (1937). Alkaline- and acid-phosphatase activities were estimated for tissues from four sites (Fig. 1): (1) the region of the supraoptic nucleus, (2) the region of the median eminence (including tissue from nucleus tuberis and small amounts of tissue from the pars tuberalis and portal capillary layer), (3) adenohypophysis, (4) neurohypophysis. These were dissected out and weighed on a torsion balance within five minutes after decapitation of the bird. The tissues were homogenized in 1 ml of chilled deionized water. The reaction mixture consisted of 0.2 ml of buffer solution, 0.2 ml of 0.2% sodium para-nitrophenyl phosphate and 0.2 ml of the homogenate. The enzymatic action was initiated by addition of the homogenate to the substrate-buffer mixture and terminated by the addition of 0.2 ml of 20% trichloracetic acid. After centrifugation a 0.6 ml aliquot was drawn from the deproteinated supernatant and added to the 0.9 ml of saturated sodium carbonate. The quantity of para-nitrophenol in the aliquot was measured from the optical density at 415 mμ using a Beckman Spectrophotometer. Phosphatase activity is expressed as μg of para-nitrophenol liberated in one hour at 37.2° C with sufficient para-nitrophenyl phosphate present so that its concentration is not rate limiting (Fig. 4 and 5). Acetate (0.2 M), veronal (0.1 M), glycine (0.1 M), and ammonium (0,1 M) buffers were used, as appropriate, to provide the desired hydrogen ion concentrations in the reaction mixtures. All determinations were controlled with blanks containing all constituents of the reaction mixture except the tissue homogenate.

The brains from some of the birds, after removal of the tissue samples, were sectioned for microscopic study in order to ascertain definitely what tissues were being used in the enzyme preparations.

Two birds from each group were used for histochemical studies at the end of the experiment. The brain, with pituitary intact, from each of these was fixed in formalin and sectioned; out of each successive trio of sections, the first was stained with aldehyde-fuchsin (GOMORI-HALMI-DAWSON) for demonstration of neurosecretory cells, the second was used for localization of alkaline phosphatase, and the third for localization of acid phosphatase.

For the histochemical demonstration of alkaline phosphatase, the revised method of Gomori was used (see PEARSE, 1953). The pieces of tissues (*ca.* $3 \times 4 \times 4$ mm) were fixed for 24 hours in a chilled mixture of formalin and 0.9% sodium chloride (1:8) and dehydrated at room temperature through a series of Et OH solutions for about five hours. The tissues were embedded in paraffin through toluene and sectioned at 10 μ. Paraffin was removed with toluene and the slides were transferred to absolute EtOH and thence through a series of EtOH solutions to deionized water. They were then immersed for 90 minutes at 37.2° C in the following reaction mixture: 25 ml 2% sodium glycerophosphate, 25 ml 2% sodium barbital, 5 ml 2% calcium chloride, 2 ml 2% magnesium sulfate, and 50 ml deionized water. Control slides were incubated in the same solution without the sodium glycerophosphate. After incubation the slides were washed several times with deionized water and then treated according to the Gomori technique.

In the histochemical localization of acid phosphatase, the tissues were subjected to the same procedures of fixation, embedding, and sectioning. Deparaffinization was effected with toluene; the slides were then passed successively through absolute acetone, 80% acetone, 70% acetone, and thence into deionized water. The sections were then incubated for 20 hours at 37.2° C in a reaction mixture prepared by the addition of 0.6 g lead nitrate and 50 ml 3% solution of sodium glycerophosphate to 500 ml 0.05 M acetate buffer pH 5.0. Two series of control sections were used. The first was treated as above except that the sodium glycerophosphate was omitted. For the second control series 0.05 M sodium fluoride (final concentration) was added to the solution. The slides were finally washed for 1.5 hours in deionized water and treated according to the Gomori technique.

The samples from the region of the median eminence (Fig. 1) contained small amounts of infundibular stalk, tuberal nuclei, pars tuberalis, and portal layer. To estimate the amount of these tissues used in the measurements of enzyme activity, the median-eminence region was removed from two birds in the same manner as it was removed for enzyme preparations. These were prepared and sectioned for microscopic examination. The individual sections were drawn on heavy paper by use of a camera lucida. The median eminence, including infundibular stem, and pars tuberalis, including the portal layer were cut out separately and weighed. Thus it was found that the amount of pars tuberalis, including portal area, attached to the sample of median eminence was about 0.015—0.020 mg. From this estimate it is obvious that the tissue from the median-eminence region used in the reaction tube contained the relatively insignificant quantity of 0.003—0.004 mg of pars tuberalis plus portal layer.

Microscopic examination was also made of the sample of supraoptic region used in the estimation of phosphatase activity. "Supraoptic regions", weighing 0.73 mg and 0.54 mg, respectively, were removed from two refractory female birds which were being held on 13-hour daily photoperiods. The tissues were prepared, sectioned, and stained with aldehyde-fuchsin. Examination of these sections showed that each contained numerous cells with aldehyde-fuchsin stainable granules.

The adenohypophysis and neurohypophysis were used *in toto* for estimations of phosphatase activity.

The experiments

1. The activity of the phosphatases as functions of hydrogen ion concentration and enzyme concentration

For these experiments we used birds which had been held in outdoor aviaries under natural conditions of temperature and photoperiod.

Tissues from eight birds were used to investigate the effect of hydrogen-ion concentration. For the individual estimates of phosphatase activity, the following concentrations of homogenates were used: adenohypophysis, 0.2 mg per ml; neurohypophysis, 0.09 mg per ml; region of median eminence, 1 mg per ml; supraoptic region, 1.5 mg per ml.

Table 1. *Acid-phosphatase activity in the region of the median eminence*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	14.4 ± 0.96 (6)[2]		RS[1]	13	15.8 ± 1.13 (6)		n. s.
6	SL	20	21.3 ± 1.24 (5)	$p < 0.01$	RL	20	17.5 ± 1.52 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	20.8 ± 0.69 (6)	$p < 0.001$	RL	20	16.7 ± 1.12 (6)	n. s.	
21	SL	20	16.9 ± 1.47 (6)	n. s.	RL	20	15.7 ± 0.62 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	17.0 ± 1.38 (6)	n. s.	RS[3]	13	18.8 ± 0.79 (6)	n. s.	n. s.

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean $\pm$ standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

Table 2. *Alkaline-phosphatase activity in the region of the median eminence*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	16.2 ± 2.27 (6)[2]		RS[1]	13	9.6 ± 1.01 (6)[2]		$p < 0.05$
6	SL	20	9.3 ± 2.13 (6)	n. s.	RL	20	5.6 ± 0.75 (5)	$p < 0.02$	
13—14	SL	20	11.4 ± 2.21 (6)	n. s.	RL	20	11.3 ± 2.54 (6)	n. s.	
21	SL	20	7.0 ± 1.55 (6)	$p < 0.01$	RL	20	7.8 ± 1.48 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	13.6 ± 1.39 (6)	n. s.	RS[3]	13	9.5 ± 0.65 (6)	n. s.	$p < 0.05$

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean $\pm$ standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

The optimum for acid-phosphatase activity in all tissues was about pH 5.4 except in the neurohypophysis where it was about pH 5.0 (Figs. 2 and 3). The optima for the alkaline-phosphatase activities were about pH 10.0 except in the neurohypophysis where it was about pH 9.6 (Figs. 2 and 3). Quantitatively acid-phosphatase activity was greater than alkaline-phosphatase activity in the supraoptic region, the region of the median eminence, and the adenohypophysis (Tables 1 to 6; Figs. 4 and 5); the relationship was the opposite in the neurohypophysis (Tables 9 and 10; Fig. 4).

At pH 5.4 and pH 10.0 enzymatic activity was a linear function of the enzyme concentrations used for each tissue (Fig. 4) for acid- and alkaline-phosphatase activities, respectively. There was also a linear relation between the amount of para-nitrophenol released and the time of incubation of the reaction mixture for periods of 40, 50, and 60 minutes (Fig. 5) when the following amounts of tissue were used in 0.6 ml of reaction mixture: 0.17 mg adenohypophysis, 0.06 mg neurohypophysis, 0.61 mg tissue from median eminence region, 0.87 mg tissue

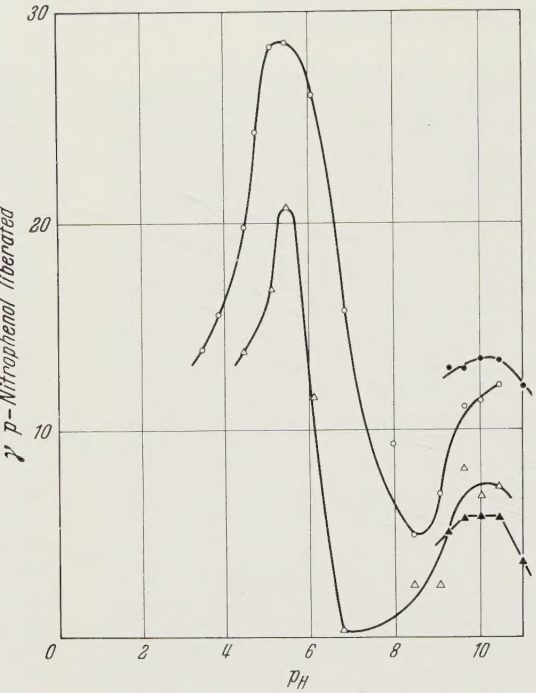


Fig. 2. Phosphatase activities in the supraoptic region and in the adenohypophysis as functions of hydrogen-ion concentration. The ordinate gives the amount of p-nitrophenol liberated per mg tissue in one hour at 37.2° C. Supraoptic region: —○—○— Acetate buffer, —●—●— Glycine buffer. Adenohypophysis: —△—△— Acetate buffer, —▲—▲— Glycine buffer

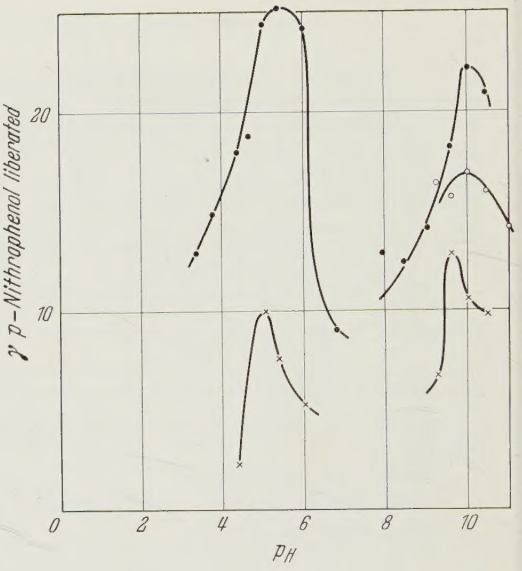


Fig. 3. Phosphatase activities in the median-eminence region and in the neurohypophysis as functions of hydrogen-ion concentration. The ordinate gives the amount of p-nitrophenol liberated per mg tissue in one hour at 37.2° C. Median-eminence region: —●—●— Acetate buffer, —○—○— Glycine buffer. Neurohypophysis: —×—×— Acetate buffer

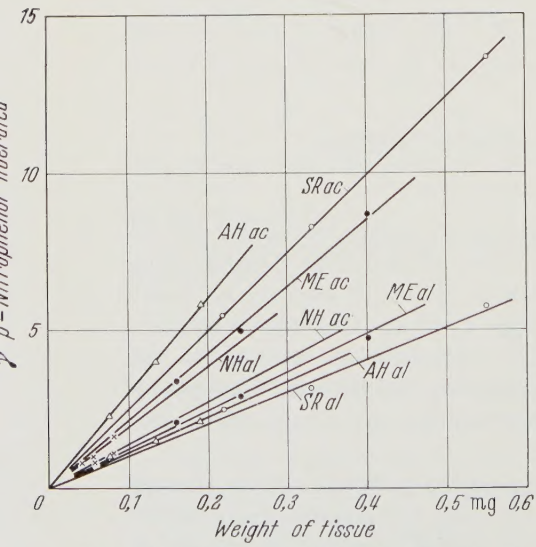


Fig. 4. Phosphatase activities as a function of enzyme concentration. *AHac* adenohypophysis, acid phosphatase; *SRac* supraoptic region, acid phosphatase; *MEac* median eminence, acid phosphatase; *NHal* neurohypophysis, acid phosphatase; *MEal* median eminence, alkaline phosphatase; *AHal* adenohypophysis, alkaline phosphatase; *SRal* supraoptic area, alkaline phosphatase. The ordinate gives the amount of p-nitrophenol liberated in one hour at 37.2° C

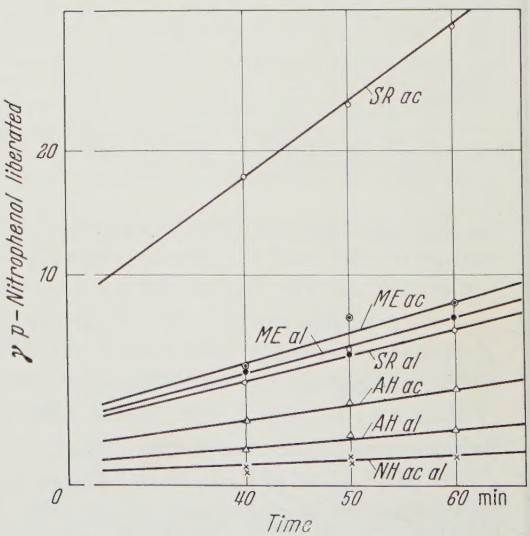


Fig. 5. Phosphatase activities as a function of reaction time. (See text for details.) *SRac* supraoptic region, acid phosphatase; *MEac* median eminence, acid phosphatase; *MEal* median eminence, alkaline phosphatase; *SRal* supraoptic region, alkaline phosphatase; *AHac* adenohypophysis, acid phosphatase; *AHal* adenohypophysis, alkaline phosphatase; *NHacal* neurohypophysis, acid phosphatase and alkaline phosphatase

from supraoptic region; in subsequent estimations of alkaline- and acid-phosphatase activities in the median-eminence and supraoptic regions about 0.06 to 0.01 mg and 0.1—0.2 mg tissue, respectively, were used in 0.6 ml of reaction mixture. Hydrogen-ion concentrations were adjusted to pH 5.4 and pH 10.0, respectively, and incubation was at 37.2° C for 60 minutes.

2. The effect of increased daily photoperiod on phosphatase activity in the hypothalamus and pituitary of photosensitive and refractory birds

It is clear from the changes in body weight (Table 12) and the testicular growth (Table 14) that the photosensitive birds (group SL) developed typical photoperiodic responses. Among the refractory birds (group RL) these responses were absent except in the cases of two birds (Table 14) which had apparently begun to escape from refractoriness.

The tissues in which phosphatase activity was estimated were removed as described above.

a) Area of the median eminence (Tables 1 and 2). As indicated above, these samples contained also nucleus tuberis and negligible amounts of pars tuberalis and portal layer. In the refractory birds (group RL) acid-phosphatase activity did not change when these birds were subjected to 20-hour daily photoperiods whereas the similarly treated photosensitive birds (group SL) showed a

Table 3. *Acid-phosphatase activity in the region of the supraoptic nucleus*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	21.6 ± 1.47 (6)[2]		RS[1]	13	23.6 ± 1.42 (6)[2]		n. s.
6	SL	20	22.9 ± 1.72 (5)	n. s.	RL	20	20.7 ± 0.99 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	24.2 ± 0.98 (6)	n. s.	RL	20	21.8 ± 2.63 (6)	n. s.	
21	SL	20	23.2 ± 0.95 (6)	n. s.	RL	20	23.0 ± 0.75 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	19.9 ± 1.09 (6)	n. s.	RS[3]	13	20.9 ± 1.52 (6)	n. s.	n. s.
All SS		8	20.7 ± 0.90 (12)	$0.02 > p > 0.01$[4]					
SL (13—14) + SL (21)		20	23.7 ± 1.54 (12)						

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean ± standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

[4] Significance of difference between all SS birds and all SL birds exposed to 20-hour daily photoperiods for at least 13 days.

Table 4. *Alkaline-phosphatase activity in the region of the supraoptic nucleus*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	12.0 ± 0.94 (6)[2]		RS[1]	13	13.7 ± 1.75 (6)[2]		n. s.
6	SL	20	10.2 ± 1.01 (5)	n. s.	RL	20	13.0 ± 1.29 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	12.3 ± 0.93 (6)	n. s.	RL	20	12.7 ± 1.72 (6)	n. s.	
21	SL	20	10.4 ± 1.39 (6)	n. s.	RL	20	11.4 ± 2.13 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	11.7 ± 1.51 (6)	n. s.	RS[3]	13	8.8 ± 1.19 (6)	$p < 0.05$	n. s.

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean $\pm$ standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

Table 5. *Acid-phosphatase activity in the adenohypophysis*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	28.0 ± 1.44 (6)[2]		RS[1]	13	23.5 ± 1.24 (6)[2]		$p < 0.05$
6	SL	20	26.9 ± 1.47 (5)	n. s.	RL	20	19.8 ± 0.82 (5)	$p < 0.05$	
13—14	SL	20	29.5 ± 0.90 (6)	n. s.	RL	20	21.8 ± 2.11	n. s.	
21	SL	20	29.3 ± 1.13 (6)	n. s.	RL	20	24.4 ± 1.12 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	29.2 ± 1.10 (6)	n. s.	RS[3]	13	24.7 ± 1.22 (6)	n. s.	$p < 0.05$

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean $\pm$ standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

Table 6. *Alkaline-phosphatase activity in the adenohypophysis*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory Birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	10.6 ± 0.89 (6)[2]		RS[1]	13	7.8 ± 2.17 (6)[2]		n. s.
6	SL	20	8.7 ± 1.72 (5)	n. s.	RL	20	9.1 ± 1.69 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	8.1 ± 0.96 (6)	n. s.	RL	20	9.4 ± 1.37 (6)	n. s.	
21	SL	20	8.0 ± 0.99 (6)	n. s.	RL	20	11.3 ± 2.85 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	9.7 ± 1.05 (6)	n. s.	RS[3]	13	8.6 ± 1.31 (6)	n. s.	n. s.

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean $\pm$ standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

Table 7. *Acid-phosphatase activity of the entire adenohypophysis*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per gland	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per gland	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	13.6 ± 1.30 (6)[2]		RS[1]	13	9.5 ± 0.75 (6)[2]		$0.05 > p > 0.02$
6	SL	20	12.9 ± 1.16 (5)	n. s.	RL	20	7.8 ± 0.68 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	15.7 ± 1.81 (6)	n. s.	RL	20	9.2 ± 0.92 (6)	n. s.	
21	SL	20	15.3 ± 1.44 (6)	n. s.	RL	20	10.7 ± 0.78 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	13.6 ± 1.32 (6)	n. s.	RS[3]	13	9.4 ± 0.89 (6)	n. s.	$0.05 > p > 0.02$

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean ± standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

Table 8. *Alkaline-phosphatase activity of the entire adenohypophysis*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per gland	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per gland	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	5.2 ± 0.54 (6)[2]		RS[1]	13	2.9 ± 0.87 (6)[2]		n. s.
6	SL	20	4.3 ± 1.18 (5)	n. s.	RL	20	3.6 ± 0.63 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	4.3 ± 0.71 (6)	n. s.	RL	20	4.0 ± 0.65 (6)	n. s.	
21	SL	20	4.2 ± 0.60 (6)	n. s.	RL	20	4.8 ± 1.01 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	4.5 ± 0.54 (6)	n. s.	RS[3]	13	3.3 ± 0.45 (6)	n. s.	n. s.

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean ± standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

marked increase in acid-phosphatase activity beginning on the 6th day and continuing at least through the 14th day. By the 21st day the activity had returned to the initial level and was the same as that of the 8 hour controls (group SS).

There was a significantly greater alkaline-phosphatase activity in the median-eminence region of the short-day photosensitive birds (group SS) than in the short-day refractory birds (group RS). Treatment with 20-hour daily photoperiods caused a decrease in activity in both groups, by the 21st day in the photosensitive birds (group SL) but by the 6th day in the refractory birds (group RL).

b) Supraoptic region (Tables 3 and 4). In the refractory birds (group RL) the acid-phosphatase activity appeared to be unaffected by long daily photoperiods. On the other hand the photosensitive birds (group SL) treated with long daily photoperiods had a significantly higher acid-phosphatase activity than the short-day photosensitive birds (group SS) (Table 3). The analyses give

no reason to believe that long daily photoperiods affected the alkaline-phosphatase activity of the supraoptic area of either group (Table 4).

c) Adenohypophysis (Tables 5—8). Since there is considerable variation in the weights of the adenohypophyses (Table 13) acid-phosphatase activity has been calculated both on the basis of activity per mg tissue and on the basis of activity per entire gland. The activity calculated on either basis (Tables 5 and 7) appears to have been unaffected by 20-hour daily photoperiods, the only possible exception being the decrease in refractory birds (group RL, Table 5), during the early part of the treatment. Since this decrease is significant only at the 5% level, and since it is not significant on the whole-gland basis (Table 7), it does not appear possible to attach biological significance to it, at least at this time. It is of importance to note, however, that photosensitive birds (groups SS, SL; Tables 5 and 7) have significantly higher acid-phosphatase activities in the adenohypophysis than refractory birds (groups RS, RL; Tables 5 and 7).

Alkaline-phosphatase activity (Tables 6 and 8) was apparently the same in the adenohypophyses of photosensitive and refractory birds and was unaffected by photoperiodic treatment.

d) Neurohypophysis (Tables 9 and 10). There were no differences in acid-phosphatase activity between the neurohypophyses of the refractory (groups RS, RL) and photosensitive (groups SS, SL) birds. Nor were there any changes in response to 20-hour photoperiods except for a decrease by the 13th—14th day of photoperiodic treatment in the refractory birds (group RL).

Table 9. *Acid-phosphatase activity in the neurohypophysis*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	13.4 ± 1.64 (5)[2]		RS[1]	13	12.2 ± 1.07 (6)[2]		n. s.
6	SL	20	14.0 ± 3.35 (5)	n. s.	RL	20	12.9 ± 1.15 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	10.8 ± 2.79 (5)	n. s.	RL	20	7.9 ± 1.33 (4)	$p < 0.05$	
21	SL	20	17.0 ± 1.37 (6)	n. s.	RL	20	14.3 ± 3.10 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	15.8 ± 2.35 (6)	n. s.	RS[3]	13	18.0 ± 1.96 (6)	$p < 0.05$	n. s.

Phosphatase activity is expressed in μg *p*-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean ± standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

The photosensitive birds (groups SS and SL) and refractory birds (groups RS and RL) showed no change in neurohypophysial alkaline-phosphatase activity with 20-hour photoperiodic treatment. The data suggest that the level of alkaline-phosphatase activity is somewhat higher in refractory birds (groups RS and RL) than in photosensitive birds (groups SS and SL).

e) Nucleus tuberis (Table 11). Four birds, at least initially refractory (group RS), were killed on 16 November and the phosphatase activities of the nucleus tuberis estimated (Table 11). The acid-phosphatase activity was significantly

Table 10. *Alkaline-phosphatase activity in the neurohypophysis*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Activity per mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[1]	8	12.7 ± 1.34 (5)[2]		RS[1]	13	23.3 ± 2.86 (6)[2]		$p < 0.02$
6	SL	20	16.8 ± 3.27 (5)	n. s.	RL	20	16.0 ± 3.79 (5)	n. s.	
13—14	SL	20	12.6 ± 2.62 (5)	n. s.	RL	20	29.0 ± 3.40 (5)	n. s.	
21	SL	20	12.2 ± 1.41 (6)	n. s.	RL	20	15.4 ± 1.42 (5)	n. s.	
22—27	SS[3]	8	18.3 ± 3.22 (6)	n. s.	RS[3]	13	23.2 ± 3.78 (6)	n. s.	n. s.

Phosphatase activity is expressed in μg p-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Initial short-day controls.

[2] Mean ± standard error; number of birds is indicated in parenthesis.

[3] Final short-day controls.

Table 11. *Phosphatase-activity in the nucleus tuberis of refractory birds*

Day of experiment	Group	Daily photoperiod hours	Acid phosphatase activity per mg	Alkaline phosphatase activity per mg
31	RS	13	19.5 ± 0.31 (4)[1]	9.9 ± 2.59 (4)[1]

Phosphatase activity is expressed in μg p-nitrophenol per mg tissue liberated in 1 hour. (See text.)

[1] Mean ± standard error; number of birds in sample is indicated in parenthesis.

different from that of the median-eminence region of refractory birds (group RS) killed at the beginning of the experiment (15 or 16 October) but was not different from the activity of this tissue from birds (group RS) killed at the end of the experiment (5 November). The alkaline-phosphatase activity of the nucleus tuberis was about the same as that of the median-eminence region.

3. Histochemical observations of phosphatase activity in the hypothalamus and associated structures

Because of the difficulty of making useful quantitative interpretations, the histochemical investigations were conducted primarily to ascertain which cells exhibited conspicuous phosphatase activity. No attempts were made to study differences between photoperiodically and non-photoperiodically treated birds or between photosensitive and non-photosensitive birds. An attempt to examine such differences histochemically is planned for the future.

a) Supraoptic and paraventricular nuclei. In the paraventricular and supraoptic nuclei there are cells which show strong acid-phosphatase reaction (Figs. 6 and 7). This reaction is observable principally in the cell nuclei and nucleoli, and is more conspicuous in the latter. Cytoplasmic acid-phosphatase reaction is generally very weak in these cells. Further investigations are necessary in order to adequately characterize these cells.

The alkaline-phosphatase activity of the hypothalamic neurosecretory cells, as indicated by the histochemical preparations, was not conspicuously different

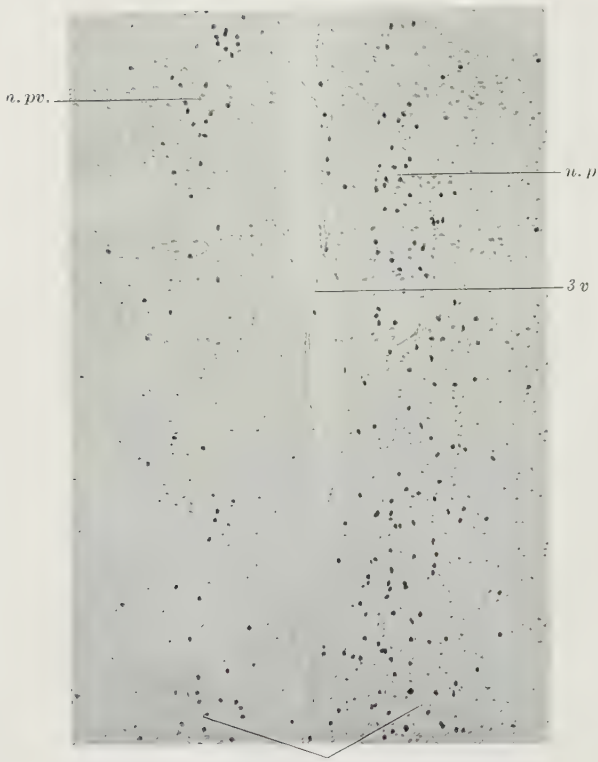


Fig. 6. Hypothalamic neurosecretory nuclei showing strong acid-phosphatase activity. No. 139372, adult female; 13-hour daily photoperiods (0800—2100); 1800, 5 November 1959. *n. pv.* nucleus paraventricularis, *n. so.* nucleus supraopticus, *3 v* third ventricle. Fixed in formalin; Gomori acid-phosphatase procedure. × 140

from that of other neurons. The reaction was weak in both the nuclei and nucleoli. Alkaline-phosphatase activity was strong in the walls of the small blood vessels of the regions of the paraventricular and supraoptic nuclei to the same extent as in other parts of the brain.

The axons of the neurosecretory cells were not identifiable by the histochemical phosphatase methods. It was often difficult, or impossible, to trace the proximal axonal tracts even with aldehyde-fuchsin stained sections. (See also OKSCHE *et al.*, 1959.)

b) Median eminence, nucleus tuberis, portal layer, and pars tuberalis. In the median eminence the nuclei and nucleoli of the ependymal and glial cells showed a strong acid-phosphatase reaction. The reaction in the fibers of the glandular layer was stronger than in other parts of the median eminence with the exception of the nuclei of the epen-

Fig. 7. Acid-phosphatase activity in the cells of the supraoptic nucleus. Same bird and preparation as in Fig. 6. × 750

dymal and glial cells (Fig. 8). There was a very strong acid-phosphatase reaction in the nuclei and nucleoli of the cells of the pars tuberalis. Also the nuclei and nucleoli of the neurones of the tuberal and mammillary nuclei were found to have a fairly strong acid-phosphatase reaction.

As in the regions of the hypothalamic nuclei, the walls of the blood vessels of these regions also showed a strong alkaline-phosphatase reaction (Figs. 9 and 10). The most important observation with respect to the vascularization of the median eminence is that capillaries penetrate into the median eminence as

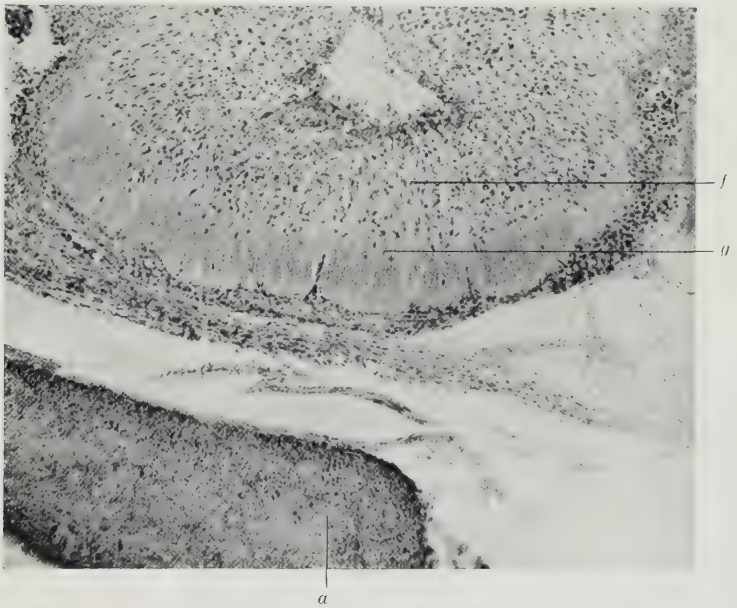


Fig. 8. Acid-phosphatase activity in the adenohypophysis and median eminence. Same bird and preparation as in Fig. 6. *f* fiber layer of the median eminence, *g* glandular layer of median eminence, *a* adenohypophysis. × 140

finger-like protrusions from the surrounding layer of fine vessels (Figs. 9 and 10). Strong alkaline-phosphatase reactions were also observed in the walls of the portal venules and veins and collagenous tissue around the pars tuberalis in the portal zone. The nuclei of the cells of the pars tuberalis showed a strong reaction, whereas the reaction of the ependymal cells, glial cells, and fibers of the median eminence was very weak (Figs. 9 and 10).

c) Pituitary body. In the adenohypophysis acid-phosphatase activity was evident in the nuclei and nucleoli and inconspicuous in the cytoplasm (Fig. 8). The cells of the adenohypophysis showed a strong alkaline-phosphatase reaction in the nuclei and nucleoli but not in the cytoplasm. The walls of the blood sinus of the adenohypophysis showed a moderate alkaline-phosphatase reaction.

In the neurohypophysis the small vessels on the surface showed a strong alkaline-phosphatase reaction. The nuclei of the ependymal and glial cells showed a moderate alkaline-phosphatase activity. Elsewhere in the neurohypophysis the reaction was very weak.

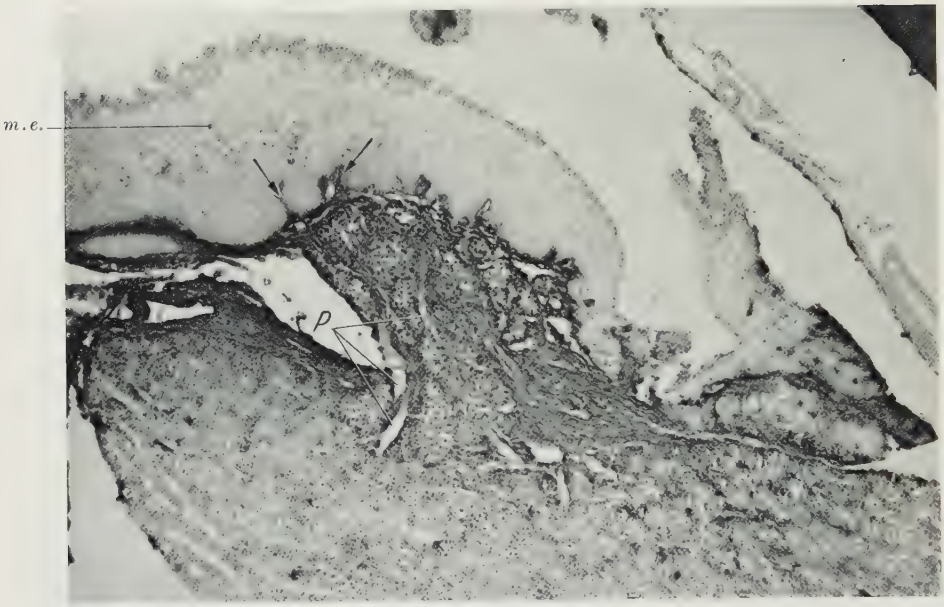


Fig. 9. Alkaline-phosphatase activity in the median eminence, portal vessels, pars tuberalis, neurohypophysis, and adenohypophysis. Same birds as in Fig. 6. *m. e.* median eminence, *p* portal vessels, ↓ fingerlike protrusions of portal vessels into the median eminence. Gomori alkaline-phosphatase procedure. ×140

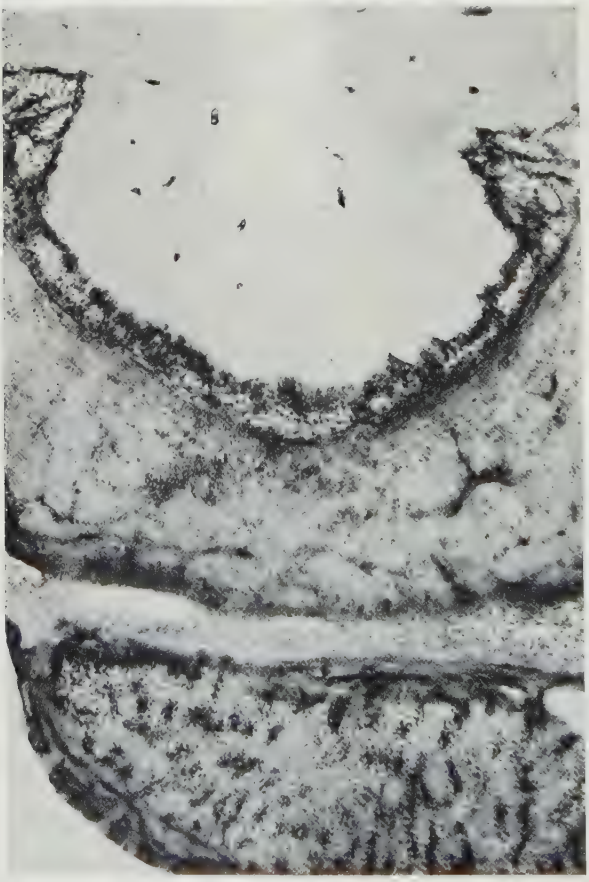


Fig. 10. Alkaline-phosphatase activity in the median eminence, pars tuberalis, and adenohypophysis. No. 139318, adult female; 13-hour daily photoperiods (0800—2100); 2100, 24 October 1959. Fixed in formalin; Gomori alkaline-phosphatase procedure. ×140

4. Other results and observations

a) Body weight (Table 12). The photosensitive birds on 20-hour photoperiods (group SL) showed the characteristic increases in body weights. This photoperiodically induced weight response has been previously demonstrated to be almost completely a reflection of fat deposition resulting from a photoperiodically induced hyperphagia (King and Farner, 1956). The refractory birds showed the weight and degree of fatness typical of the autumnal migratory period (King, 1957; Farner, unpublished). Unlike the situation in spring, the adiposity of the autumnal premigratory and migratory periods is not directly photoperiodically controlled.

Table 12. *Body weight*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)			
	Group	Daily photoperiod hours	Body weight g	Deviation from 0 day g	Group	Daily photoperiod hours	Body weight g	Deviation from 0 day g
0	SS[1]	8	25.6 (6)	0	RS[1]	13	33.6 (6)	0
6	SL	20	27.4 (5)	+2.9	RL	20	32.1 (5)	+1.3
13—14	SL	20	34.0 (6)	+7.1	RL	20	31.4 (6)	+0.6
21	SL	20	31.7 (6)	+5.5	RL	20	31.4 (5)	+3.7
22—27	SS[2]	8	25.6 (6)	−0.2	RS[2]	13	35.2 (6)	+5.5

[1] Initial short-day controls.
[2] Final short-day controls.

b) Adenohypophysial weight (Table 13). The weights of the adenohypophyses of photosensitive birds (groups SS and SL) were significantly greater than those of refractory birds (groups RS and RL) regardless of the photoperiodic treatment.

Table 13. *Weight of the adenohypophysis*

ay of xperiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Adenohypophysial weight[1] mg	Significance of deviation from 0 day	Group	Daily photoperiod hours	Adenohypophysial weight[1] mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[2]	8	0.48 ± 0.03 (6)		RS[2]	13	0.40 ± 0.01 (6)		0.05 > p > 0.02
6	SL	20	0,48 ± 0.03 (5)	n. s.	RL	20	0.39 ± 0.02 (5)	n. s.	
3—14	SL	20	0.53 ± 0.05 (6)	n. s.	RL	20	0.42 ± 0.02 (6)	n. s.	
21	SL	20	0.52 ± 0.04 (6)	n. s.	RL	20	0.44 ± 0.02 (6)	n. s.	
2—27	SS[3]	8	0.46 ± 0.02 (6)	n. s.	RS[3]	13	0.38 ± 0.03 (5)	n. s.	0.05 > p > 0.02
All S			0.50 ± 0.016 (29)		All R		0.41 ± 0.0089 (28)		p < 0.001

[1] Mean ± standard error. Number of birds in each sample is indicated in parenthesis.
[2] Initial short-day controls.
[3] Final short-day controls.

Although it appears superficially that both photosensitive and refractory birds developed heavier adenohypophyses during long daily photoperiods, analyses of data indicate that the differences are not statistically different ($p = ca.\ 0.15$).

Because of an apparent tendency to become heavier in long photoperiods, a re-examination with much larger numbers of birds seems in order.

c) Testicular weight (Table 14). The photosensitive birds (group SL) showed typical testicular responses to long daily photoperiods. Because of the overlapping of the 95% fiducial limits of the logarithmic growth-rate constant, k (FARNER and WILSON, 1957), no significance can be attached to the apparently

Table 14. *Testicular growth*

Day of experiment	Photosensitive (non-refractory) birds (S)				Refractory birds (R)				Significance of difference in testicular weight between S and R
	Group	Daily photoperiod hours	Testicular weight[1] mg	k^2 days^{-1}	Group	Daily photoperiod hours	Testicular weight[1] mg	Significance of deviation from 0 day	
0	SS[3]	8	1.14 ± 0.15 (6)		RS[3]	13	0.60 ± 0.18 (6)		$p < 0.05$
9	SL	20	2.99 ± 0.32 (5)	0.069 ± 0.028	RL	20	0.56 ± 0.06 (5)	n. s.	
13 –14	SL	20	40.4 ± 7.8 (6)	0.132 ± 0.040	RL	20	0.95 ± 0.27 (6)[4]	n. s.	
21	SL	20	222 ± 37 (6)	0.112 ± 0.051	RL	20	0.69 ± 0.11 (5)[4]	n. s.	
22—27	SS[5]	8	1.18 ± 0.11 (6)		RS[6]	13	0.69 ± 0.08 (6)	n. s.	$p < 0.01$

[1] Mean $\pm$ standard error. Number of birds in each sample is indicated in parenthesis.

[2] Logarithmic growth rate constant with 95% fiducial limits. For further definition and discussion of k, see FARNER and WILSON (1957).

[3] Initial short-day controls.

[4] Each of these groups contained one partially photosensitive bird which has been omitted from the calculations.

[5] Final short-day controls.

lower growth rate of the first week, although this needs further investigation. The initial testicular weights of the photosensitive birds (group SS) were significantly greater than those of the refractory birds (group RS).

The experiments were conducted near the end of the period of natural refractoriness (FARNER and MEWALDT, 1955). Two birds in group RL showed some testicular response to 20-hour photoperiods and were excluded from the calculations. (See footnote, Table 14.)

d) Aldehyde-fuchsin stained granules in the median eminence. In the photosensitive birds there was a marked decrease of aldehyde-fuchsin-positive neurosecretory material in the median eminence in birds killed during the daily photoperiod after a 27-day treatment with 20-hour photoperiods. This decrease was similar to that noted previously by OKSCHE *et al.* (1959). On the other hand 20-hour photoperiods failed to cause a similar decrease in neurosecretory material of the median eminence of refractory birds.

Discussion

The increase in acid-phosphatase activity in the median-eminence samples of the long-day photosensitive birds (group SL, Table 1) suggests that they must contain sites of increased energy metabolism during photoperiodic stimulation. The histochemical evidence suggests that much of the activity occurs within or at the surface of the nerve fibers, presumably the neurosecretion-bearing axons,

of the glandular layer of the median eminence. It should be noted that the occurrence of acid phosphatase in nerve fibers is well known. (See, for example, Smith, 1948; Shimizu, 1950; Leduc and Wislocki, 1952.) However, of particular significance here is its increase in the region in which it is highly probable that a humoral transfer must occur between the axons of the hypothalamic neurosecretory cells and the capillaries of the hypophysial portal system (Assenmacher, 1957a, b, 1958; Assenmacher and Benoit, 1953a, b, 1956, 1958; Benoit, 1957; Benoit and Assenmacher, 1953a, b, 1955, 1959; Wingstrand, 1951). As noted above from our own studies, the area of contact for possible transfer of materials is greatly increased by finger-like processes containing capillaries which extend into the median eminence (Fig. 10). As noted above, the acid-phosphatase activity of the nucleus tuberis (Table 11) is similar to that of the median-eminence samples; also histochemically it is evident (Fig. 8) that there is considerable acid-phosphatase activity in the cell nuclei of the nucleus tuberis. Consequently, we cannot exclude the possibility that the photoperiodically induced increase in acid-phosphatase activity in the median-eminence samples may be in part the result of an increase also in the activity of the nucleus tuberis. However, it is highly improbable that the increased activity of these samples (Table 1) could result only from an increase in activity of the nucleus tuberis because of the histochemically demonstrated distribution of the acid phosphatase (Fig. 8) and further because of the relatively small amount of nucleus-tuberis tissue in the median-eminence sample. As noted above, the amounts of pars tuberalis and portal-layer tissue in the median-eminence samples is sufficiently slight to permit exclusion from any importance in the photoperiodically induced increase in acid-phosphatase activity. The decrease in the density of neurosecretory granules in the median eminence of photosensitive birds subjected to 20 hour photoperiods, as described by Oksche *et al.* (1959), suggests that there must be an increase in some sort of energy-requiring process in the neurosecretion-bearing axons in the glandular layer of the median eminence. It is probable that the increase in acid-phosphatase activity in the median-eminence samples from group SL (Table 1) is related to an enhanced release mechanism, perhaps involving the breakdown of the stainable neurosecretory granules into smaller non-stainable particles and the transfer of these from axons to capillaries, or possibly the transfer of an active non-stainable compound which travels with the stainable neurosecretory material in the axons.

It is of importance to note that after the testes of photosensitive birds reach a combined weight of about 200 mg, at about the 20th day of the 20-hour daily photoperiods (Table 14; see also Farner and Wilson, 1957), there is a marked and continuous reduction in their rate of growth (Farner and Wilson, 1957). This correlates well with the reduction of acid-phosphatase activity in the median eminence by the 21st day of 20-hour daily photoperiods (Table 1). This would appear to emphasize further the possibility that acid phosphatase in the median eminence is involved in a transfer mechanism. It is of further pertinence that the photoperiodically induced hyperphagia also begins to decline between the 10th and 20th day of 20-hour daily photoperiods (King, 1957).

Particularly important in our argument concerning the role of acid-phosphatase activity in the median eminence is that long daily photoperiods failed to

alter the density of neurosecretory material in the median eminence of refractory birds, failed to alter the acid-phosphatase activity (group RL, Table 1), and caused neither testicular (group RL, Table 14) nor metabolic responses (group RL, Table 13).

It is difficult at present to interpret our data on alkaline-phosphatase activity in the median eminence. It appears that short-day refractory birds (group RS, Table 2) may have a lower activity than short-day photosensitive birds (group SS, Table 2); long daily photoperiods have a suppressing effect in photosensitive birds (group SL, Table 2) and perhaps to a lesser extent in refractory birds (group RL, Table 2).

Of particular interest in the function of the hypothalamic neurosecretory system is the source of the neurosecretory material with which is associated, or from which is derived, the humoral agent which apparently must pass into the capillaries of the hypophysial portal system. We are at present of the opinion that this material most probably comes from neurosecretory cells of the supraoptic and/or paraventricular nuclei which, morphologically, are essentially continuous in *Zonotrichia leucophrys gambelii* (Oksche *et al.*, 1959). Our opinion concerning the origin of this material is based extensively on the experiments and arguments of Assenmacher (1957a) and Benoit (1958). It was found that bilateral lesions in the supraoptic and paraventricular regions of ducks caused genital atrophy and a disappearance of aldehyde-fuchsin stainable material in the median eminence. Further, in this laboratory (Oksche *et al.*, 1959) we have found close correlations among the photoperiodically induced gonadotropic activity of the adenohypophysis, the reduction in the amount of aldehyde-fuchsin stainable granules in the median eminence, and cytoplasmic and nuclear changes in the neurosecretory cells of the supraoptic and paraventricular nuclei in *Z. l. gambelii*. However, our incomplete karyometric studies (Oksche, Westrum, Kamemoto, Laws, unpublished) do strongly suggest that by no means all of the cells in these nuclei are involved. In the female domestic fowl there is an increase in activity and the size of cell nuclei in the paraventricular nucleus during egg-laying and incubation whereas there is little, if any change, in the cells of the supraoptic nucleus (H. Legait 1955a, b, 1959). In our present investigation, the photoperiodically induced increase in acid phosphatase in the long-day photosensitive birds (group SL, Table 3) is consistent with our opinion that the photoperiodic response involves increased activity in the supraoptic nucleus although our data do not allow us to attribute this necessarily to an increase in acid-phosphatase activity in the neurosecretory cells. It is possible that the acid-phosphatase activity in individual cells increased substantially more than is indicated by Table 3 since those cells with acid-phosphatase activity constituted only a small part of the supraoptic-region samples.

It must be borne in mind in comparing photostimulated *Z. l. gambelii* with photostimulated ducks (Benoit and Assenmacher, 1955, 1959, etc.) and with the domestic hen (H. Legait, 1959, etc.) that the former has not only a marked gonadotropic response (Table 14) but also a marked metabolic response as indicated by hyperphagia (King and Farner, 1956) and fat deposition (King and Farner, 1959). It is hoped that subsequent comparisons of *Z. l. gambelii* with the non-migratory *Z. l. nuttalli*, which has no comparable photoperiodically induced

hyperphagia and fat deposition, will contribute toward a solution of the identity of functions of the various hypothalamic neurosecretory cells. Certainly among the most challenging problems is that of the degree of specialization of function among the hypothalamic neurosecretory cells and tracts not only with respect to the humoral control of the adenohypophysis, but also with respect to the production of the "posterior-lobe" hormones. (See, for example, Olivecrona, 1957; Bargmann, 1954, 1958; Scharrer and Scharrer, 1954a, b; Assenmacher and Benoit, 1958; Stutinsky, 1958; Ortmann, 1960; Diepen and Engelhard, 1958).

The adenohypophysis, through its release of gonadotropins, is also an integra part of the gonadal photoperiodic response system. (See Benoit and Assenmacher, 1953, 1959; Benoit, 1957; Farner, 1959, for reviews.) It is therefore of importance to examine the phosphatase activity of this gland during the period of photoperiodic response. Our data, analyzed both on the basis of phosphatase activity per milligram of tissue and on the basis of activity per entire gland, show no significant change in activity with the photoperiodically induced increased release in gonadotropins (Tables 5—8). On the other hand there is a significantly greater acid-phosphatase activity in all photosensitive birds regardless of photoperiodic treatment (Tables 5—7). This might suggest a higher rate of hormone synthesis and that long-daily photoperiods simply provide for an increased release, a process which may not be reflected in a significant alteration in phosphatase activity. It is possible that larger experimental groups might have resulted in the demonstration of a statistically significant increase in acid phosphatase in the long-day photosensitive birds (Table 7). For the available data, however, the difference between all eight-hour birds (both SS groups) and 20-hour birds (SL, 13—14 plus SL, 21) is not significant ($p = ca.\ 0.15$). The suggestion that long daily photoperiods merely accelerate the release of gonadotropins from the adenohypophysis is consistent with the observations of Benoit *et al.*, (1950) who found greater quantities of gonadotropins in the adenohypophyses of drakes maintained in darkness than in photoperiodically stimulated drakes with growing testes. In male Ring-necked Pheasants, *Phasianus colchicus*, Greeley and Meyer (1953) found significant pituitary gonadotropin levels in the fall when testes were in complete regression. In spring, with increasing daily photoperiods, there was an increase in gonadotropin content of the adenohypophysis with an almost parallel increase in testicular weight.

The similarity of refractory and photosensitive birds with respect to alkaline-phosphatase activity in the adenohypophysis emphasizes the probability, as noted above, that it is acid phosphatase that is more closely associated with hormone synthesis.

The absence of a photoperiodic effect on the phosphatase activity of the neurohypophysis of photosensitive birds is consistent with the observations of Oksche *et al.* (1959) which indicate that long daily photoperiods do not affect its content of aldehyde-fuchsin positive material. We are unable at present to attach any biological significance to the changes in acid-phosphatase activity in long-day refractory birds (Table 9). Furthermore, we are unable to attach biological significance to the observed differences in alkaline-phosphatase activity of the neurohypophyses of refractory and photosensitive birds (Table 10).

As noted above there are cells in the supraoptic and paraventricular nuclei with strong acid-phosphatase activity (Fig. 6 and 7). At present we do not understand the nature and significance of these cells which are somewhat smaller than the neurosecretory cells. The neurosecretory cells did not show conspicuous alkaline- and acid-phosphatase reactions although marked acid-phosphatase reactions have been demonstrated in the hypothalamic neurosecretory cells of mammals by several investigators (Eränkö, 1951; Scharrer and Scharrer, 1954b; Talanti *et al.*, 1958; Kivalo *et al.*, 1958; Rinne *et al.*, 1958; Kobayashi and Kambara, 1959b). The weak alkaline-phosphatase reaction in the hypothalamic neurosecretory cells of *Z. l. gambelii*, however, is consistent with observations on mammals (Sloper, 1955; Imoto, 1955; Kobayashi and Kambara, 1959b) except for the report of high alkaline-phosphatase activity in the cytoplasm of the neurosecretory cells of the cat (Schiebler, 1951).

The fine blood vessels in the hypothalamus displayed a very pronounced alkaline-phosphatase reaction. This permitted a careful study of their distribution, which revealed a relatively dense vascularization about the paraventricular and supraoptic nuclei as is the case in mammals (Scharrer, 1936; Shimizu, 1950; Kobayashi and Kambara, 1959b).

The conspicuous alkaline-phosphatase activity of the sinus walls of the adenohypophysis (Figs. 9 and 10) is very similar to that of the rat. The distribution of blood vessels in the neurohypophysis as shown by alkaline-phosphatase activity is strikingly different from that of mammals. In *Z. l. gambelii* the vessels surround the organ superficially in contrast to the denser internal arrangement in rats (Kobayashi and Kambara, 1959a). This may be a consequence of the more primitive structure of the neurohypophysis of *Z. l. gambelii* (Oksche *et al.*, 1959) and many other species of birds (Wingstrand, 1951).

Summary

1. The metabolic activity of the hypothalamo-hypophysial neurosecretory system of the White-crowned Sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*, has been investigated by means of quantitative estimates of acid- and alkaline-phosphatase activity. The activities of samples from the median eminence, samples from the supraoptic region, the adenohypophyses, and the neurohypophyses of photosensitive and refractory birds, both subjected to short and long daily photoperiods, have been compared. Histochemical demonstrations of the distribution of acid- and alkaline-phosphatase activity have been effected to provide a better basis for interpretation of the quantitative data.

2. The photosensitive birds which were subjected to 20-hour daily photoperiods showed the typical photoperiodically induced testicular growth and fat deposition. There was an increase in acid-phosphatase activity in the supraoptic region. This increase in acid-phosphatase activity may be correlated with increased activity of the neurosecretory cells as indicated by cytologic criteria, including an increased rate of formation of aldehyde-fuchsin stainable material. No such increase in acid phosphatase occurred in refractory birds on 20-hour photoperiods. In photosensitive birds, there was also an increase in acid-phosphatase activity in the median eminence, an increase which appears to be attributable primarily to changes in activity of the axons in the glandular layer although

a contribution by the nucleus tuberis cannot be excluded. The change in acid-phosphatase activity in the median eminence coincides well with the observed increase in rate of disappearance of aldehyde-fuchsin-positive granules from the axons. Neither an increase in acid phosphatase nor a decrease in granules occurred in the median eminences of refractory birds subjected to 20-hour daily photoperiods. The acid-phosphatase activity of the adenohypophyses of photosensitive birds was greater than in refractory birds although neither was affected by long daily photoperiods. These results are consistent with the hypothesis that the photoperiodic response in *Zonotrichia leucophrys gambelii* involves, in the supraoptic region, an increase in acid-phosphatase activity associated with increased synthesis of aldehyde-fuchsin-positive material in the neurosecretory cells, and, in the axons of the glandular layer of the median eminence, an essentially simultaneous increase in acid-phosphatase activity associated with a humoral transfer to the capillaries of the hypophysial portal system. Our data suggest that the higher rate of production of gonadotropins in the adenohypophysis by photosensitive birds involves a higher acid-phosphatase activity but that the photoperiodically induced increase in release of these gonadotropins, mediated by a humoral agent in the hypophysial blood, does not involve a detectable further increase in acid-phosphatase activity.

3. The data on alkaline phosphatase in supraoptic-region, median-eminence region, and adenohypophysis give no indication that this enzyme is involved in the photoperiodically induced activity of the hypothalamo-hypophysial system.

4. In agreement with previous investigations in this laboratory (Oksche *et al.*, 1959), the data obtained in this investigation on phosphatase activity indicate no participation by the neurohypophysis in the photoperiodic response.

5. The histochemical observations indicate that the neurosecretory cells of the paraventricular and supraoptic nuclei have acid- and alkaline-phosphatase activities similar to those of ordinary neurones. The axons of neurosecretory cells, except in the median eminence, are not identifiable by histochemical demonstration of phosphatase activity. In the fibers of the glandular layer of the median eminence there is a pronounced acid-phosphatase, but no alkaline-phosphatase reaction, in these fibers. Also the nuclei and nucleoli of cells of the mammillary and tuberal nuclei have a fairly strong acid-phosphatase activity. In the adenohypophysis there is a conspicuous acid-phosphatase and a strong alkaline-phosphatase reaction in the nuclei and nucleoli, but only slight activities in the cytoplasm.

References

Aschoff, J.: Jahresperiodik der Fortpflanzung bei Warmblütern. Studium gen. **8**, 742—776 (1955).

Assenmacher, I.: Répercussions de lésions hypothalamiques sur le conditionnement génital du canard domestique. C. R. Acad. Sci. (Paris) **245**, 210—213 (1957a).

Assenmacher, I.: Nouvelles données sur le rôle de l'hypothalamus dans les régulations hypophysaires gonadotropes chez le canard domestique. C. R. Acad. Sci. (Paris) **245**, 2388—2390 (1957b).

Assenmacher, I.: Recherches sur le contrôle hypothalamique de la fonction gonadotrope préhypophysaire chez le canard. Arch. Anat. micr. Morph. exp. **47**, 447—572 (1958).

Assenmacher, I., et J. Benoit: Contribution à l'étude des relations de la substance Gomori-positive avec le complexe hypophysaire et la gonadostimulation chez le canard domestique. C. R. Acad. Sci. (Paris) **236**, 133—135 (1953a).

Assenmacher, I., et J. Benoit: Répercussions de la section du tractus porto-tubéral hypophysaire sur la gonadostimulation par la lumière chez la canard domestique. C. R. Acad. Sci. (Paris) **236**, 2002—2004 (1953b).

Assenmacher, I., et J. Benoit: Nouvelles recherches sur les relations entre la neurosécrétion hypothalamique, le system porte hypophysaire et l'activité gonadotrope de la préhypophyse. C. R. Acad. Sci. (Paris) **242**, 2986—2988 (1956).

Assenmacher, I., et J. Benoit: Quelques aspects du contrôle hypothalamique de la fonction gonadotrope de la préhypophyse. Pathophysiologia Diencephalica. Internat. Symposium, Mailand, 1956. Wien: Springer 1958.

Bargmann, W.: Das Zwischenhirn-Hypophysensystem. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.

Bargmann, W.: Die endokrine Tätigkeit des Zwischenhirns und seine Beziehungen zu anderen endokrinen Drüsen. Pathophysiologica Diencephalica. Internat. Symposium, Mailand, 1956. Wien: Springer 1958.

Benoit, J.: Les glandes endocrines. In: Traité de Zoologie, tome XV. Paris: Masson & Cie. 1950a.

Benoit, J.: Reproduction-caractères sexuels et hormones-déterminisme du cycle sexuelle saisonnier. In: Traite de Zoologie, tome XV. Paris: Masson & Cie. 1950b.

Benoit, J.: Radiation lumineuses et activité sexuelle du Canard. Rev. suisse Zool. **64**, 577—587 (1957).

Benoit, J., et I. Assenmacher: Rapport entre la stimulation sexuelle préhypophysaire et la neurosécrétion chez l'oiseau. Arch. Anat. micr. Morph. exp. **42**, 334—386 (1953a).

Benoit, J., et I. Assenmacher: Action des facteurs externes et plus particulièrement du facteur lumineux sur l'activité sexuelle des oiseaux. II. Réun. des Endocrinologistes de Langue Française, p. 33—80, 1953b.

Benoit, J., et I. Assenmacher: Le controle hypothalamique de l'activité préhypophysaire gonadotrope. J. Physiol. (Paris) **47**, 427—567 (1955).

Benoit, J., and I. Assenmacher: The control by visible radiations of the gonadotropic activity of the duck hypophysis. Recent Progr. Hormone Res. **15**, 143—164 (1959).

Benoit, J., I. Assenmacher et F. X. Walter: Activité gonadotrope de l'hypophyse du canard domestique, au cours de la régression testiculaire saisonnière et de la prépuberté. C. R. Soc. Biol. (Paris) **144**, 1403—1407 (1950).

Diepen, R., u. Fr. Engelhardt: Neuronale Phänomene im Hypothalamus-Hinterlappensystem. Pathophysiologica Diencephalica. Internat. Symposium, Mailand, 1956. Wien: Springer 1958.

Eränkö, O.: Histochemical evidence of intense phosphatase activity in the hypothalamic magnocellular nuclei of the rat. Acta physiol. scand. **24**, 1—6 (1951).

Farner, D. S.: The annual stimulation of migration: its physiologic basis. In: Recent studies in avian biology. Urbana: Univ. Illinois Press 1955.

Farner, D. S.: Photoperiodism in animals with special reference to avian testicular cycles. In: Photobiology. Oregon State College Biology Colloquium, p. 17—29. 1958.

Farner, D. S.: Photoperiodic control of annual gonadal cycles in birds. In: A symposium on photoperiodism and related phenomena in plants and animals. Amer. Ass. Adv. Sci. Publ. **55**, 717—750 (1959).

Farner, D. S., and L. R. Mewaldt: The natural termination of the refractory period in the white-crowned sparrow. Condor **57**, 112—116 (1955).

Farner, D. S., and A. C. Wilson: A quantitative examination of testicular growth in the white-crowned sparrow. Biol. Bull. **113**, 254—267 (1957).

Greeley, F., and R. K. Meyer: Seasonal variation in testis-stimulating activity of male pheasant glands. Auk **70**, 350—358 (1953).

Grignon, G.: Développement du complexe hypothalamo-hypophysaire chez l'embryon de poulet. Nancy: Société d'impressions typographiques 1956.

Imoto, T.: Der histochemische Befund des Neurosekretes im Hypothalamus-Hypophysensystem beim Hunde. Arch. Histol. Jap. **8**, 361—368 (1955).

King, J. R.: Bioenergetics and regulation of vernal premigratory adiposity in the white-crowned sparrow *(Zonotrichia leucophrys gambelii)*. Doctoral Thesis. State College of Washington 1957.

King, J. R., and D. S. Farner: The bioenergetic basis of light-induced fat deposition in the white-crowned sparrow. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **93**, 354—359 (1956).

King, J. R., and D. S. Farner: Premigratory changes in body weight and body fat in wild and captive male white-crowned sparrows. Condor **61**, 315—324 (1959).

Kivalo, E., U. K. Rinne and S. Mäkelä: Acetylcholinesterase, and phosphatase, and succinic dehydrogenase in the hypothalamic magnocellular nuclei after chlorpromazine administration. Experientia (Basel) **14**, 293—296 (1958).

Kivalo, E., U. K. Rinne and P. Marjanen: Diuretic effect of chlorpromazine. With special reference to the hypothalamic neurosecretory substance. Ann. Med. exp. Fenn. **36**, 185—190 (1958).

Kobayashi, H., and S. Kambara: Alkaline phosphatase activity in the pituitary body of the rat. Endocrinology **64**, 615—618 (1959a).

Kobayashi, H., and S. Kambara: Phosphatase activity of hypothalamus and pituitary body of the rat, with special reference to neurosecretion. Jap. J. Zool. **12**, 319—328 (1959b).

Leduc, E. H., and G. B. Wislocki: The histochemical localization of acid and alkaline phosphatases, nonspecific esterase and succinic dehydrogenase in the structures comprising the hematoencephalic barrier of the rat. J. comp. Neurol. **97**, 241—280 (1952).

Legait, E., et H. Legait: Relations entre les noyaux hypothalamiques neurosécrétoires et les régions septales et habénulaires chez quelques oiseaux. Acta neuroveg. (Wien) **17**, 143—147 (1957).

Legait, H.: L'hydrencéphalocrinie neurosécrétoire chez la Poule Rhode-Island au cours du cycle annuel et dans diverses conditions expérimentales. C. R. Soc. Biol. (Paris) **149**, 1459—1461 (1955a).

Legait, H.: Variations indépendantes d'activité des noyaux paraventriculaires et supra-optiques au cours de cycle annuel et de la couvaison chez la Poule Rhode-Island. C. R. Soc. Biol. (Paris) **149**, 561—562 (1955b).

Legait, H.: Les voies efférentes des noyaux neurosécrétoires hypothalamiques chez les oiseaux. C. R. Soc. Biol. (Paris) **150**, 996—998 (1956).

Legait, H.: Anatomie microscopique des noyaux hypothalamiques et leurs voies efférentes chez la Poule Rhode-Island. Acta neuroveg. (Wien) **15**, 252—262 (1957).

Legait, H.: Les voies extra-hypothalamo-neurohypophysaires de la neurosécrétion diencephalique dans la série des Vertébrés. 2. Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund, S. 42—51. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.

Legait, H.: Contribution a l'étude morphologique et expérimentale du système hypothalamo-neurohypophysaire de la Poule Rhode-Island. Thèse, Louvain. Nancy: S. I. T. 1959.

Legait, H., et E. Legait: Relations entre les noyaux hypothalamiques neurosécrétoires et les régions septale et habénulaire chez quelques oiseaux. Pathophysiologia Diencephalica. Internat. Symposium, Mailand, 1956. Wien: Springer 1958.

Mewaldt, L. R., and D. S. Farner: The composition of a wintering population of white-crowned sparrows in southeastern Washington. Condor **55**, 313—314 (1953).

Miller, A. H.: The occurrence and maintainence of the refractory period in crowned sparrows. Condor **56**, 13—20 (1954).

Ohmori, Y.: Über die Phosphomonoesterase. Enzymologia **4**, 217—231 (1937).

Oksche, A., D. Laws, F. I. Kamemoto and D. S. Farner: The hypothalamo-hypophysial neurosecretory system of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. Z. Zellforsch. **51**, 1—42 (1959).

Olivecrona, H.: Paraventricular nucleus and pituitary gland. Acta physiol. scand. **40**, Suppl. 136, 178 pp. (1957).

Ortmann, R.: Neurosecretion. In Handbook of Physiology, Sect. 1, Neurophysiology, vol. II, p. 1038—1065. Washington: Amer. Physiol. Soc. 1960.

Pearse, A. G. E.: Histochemistry, Theoretical and Applied. London: Churchill 1953.

Rinne, U. K., and E. Kivalo: Effect of dehydration and rehydration on the acid phosphatase activity of the hypothalamic magnocellular nuclei. Ann. Med. exp. Fenn. **36**, 350—355 (1958).

Scharrer, E.: Vergleichende Untersuchungen über die zentralen Anteile des vegetativen System. Z. Anat. **106**, 169—192 (1936).

Scharrer, E., and B.: Hormones produced by neurosecretory cells. Recent Progr. Hormone Res. **10**, 183—240 (1954a).

Scharrer, E. u. B.: Neurosekretion. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6, Teil 5, S. 953—1066. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954b.

Schiebler, T. H.: Zur Histochemie des neurosekretorischen Hypothalamisch-neurohypophysären Systems. Acta anat. (Basel) **13**, 233—255 (1951).

Shimizu, N.: Histochemical studies on the phosphatase of the nervous system. J. comp. Neurol. **93**, 201—217 (1950).

Slofer, J. C.: Hypothalamic neurosecretion in the dog and cat, with particular reference to the identification of neurosecretory material with posterior lobe hormones. J. Anat. (Lond.) **89**, 301—316 (1955).

Smith, W. K.: The results of application of the acid phosphatase method to nervous tissue after formalin fixation. Anat. Rec. **102**, 523—532 (1948).

Stutinsky, F.: Rapports du neurosécrétat hypothalamique avec l'adénohypophyse dans conditions normales et expérimentales. Pathophysiologica Diencephalica. Internat. Symposium, Mailand, 1956. Wien: Springer 1958.

Talanti, S., E. Kivalo and A. Kivalo: The acid phosphatase activity in the hypothalamic magnocellular nuclei of the cow embryo. Acta endocr. (Kbh.) **29**, 302—306 (1958).

Wingstrand, K. G.: The structure and development of the avian pituitary. Lund: Gleerup 1951.

Wolfson, A.: Production of repeated gonadal, fat, and molt cycles within one year in the junco and white-crowned sparrow by manipulation of day length. J. exp. Zool. **125**, 353—376 (1954).

Wolfson, A.: Ecologic and physiologic factors in the regulation of spring migration and reproductive cycles in birds. In: Comparative physiology. Proc. Columbia Univ. Symposium on Comparative physiology, p. 38—70. New York: Wiley 1959.

Prof. Dr. Hideshi Kobayashi, Zoological Institute,
Faculty of Science Tokyo University, Tokyo (Japan)

Prof. Dr. Donald S. Farner, Laboratories of Zoophysiology, Department of Zoology,
Washington State University, Pullman, Washington, U.S.A.

Zeitschrift für Zellforschung 53, 25—49 (1960)

Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten und dem Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie am Zoologischen Institut der Universität Bonn

ZUR FUNKTIONELLEN MORPHOLOGIE DER SPEICHELDRÜSEN VON HOMOPTEREN

IV. Mitteilung

DIE AUSFÜHRGÄNGE DER SPEICHELDRÜSEN VON *MYZUS PERSICAE* (SULZ.), *APHIDIDAE*

Von

V. Moericke und K. E. Wohlfarth-Bottermann

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juli 1960)

Einleitung und Fragestellung

Die paarigen Speicheldrüsen der Röhrenblattläuse sind mit einem gemeinsamen Ausführgang (*gAG*, vgl. Abb. 1) verbunden. Dieser gemeinsame Ausführgang vereinigt die beiden Ausführgänge der Hauptdrüse (AG_1), die ihrerseits jeweils den Ausführgang der Nebendrüse (AG_2) aufnehmen. Die Ausführgänge dringen tief in die Hauptdrüse (*HD*) — und zwar paarig in jeden der beiden Lappen — und in die Nebendrüse (*ND*) ein. Das charakteristische lichtmikroskopische Merkmal aller Ausführgänge ist ihr Aufbau aus einem zentralen Sekretkanal (*K*) mit einem Durchmesser von etwa $^1/_2\mu$ und besonderen, kleinen „Kanalzellen", die den Kanal rings umgeben. Über den Modus, wie das Sekret der Drüsenzellen in den Kanal gelangt und über die Funktion der Kanalzellen liegen bisher keine gesicherten Befunde vor. Nach Weber (1928) soll sich der Kanal im Bereich der Hauptzellen der Hauptdrüse in feine Verästelungen aufspalten, so daß von jeder Hauptdrüsenzelle das Sekret unmittelbar in den Kanal gelangen kann. Unsere elektronenmikroskopischen Untersuchungen lassen hierzu nähere

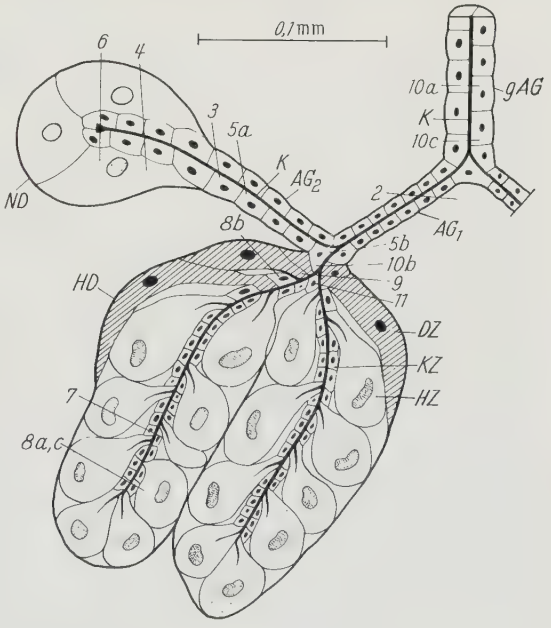


Abb. 1. Schematische Darstellung der Speicheldrüse von *Doralis fabae* (Scop.) nach Weber (1928); teilweise verändert. AG_1 Ausführgang der Hauptdrüse; AG_2 Ausführgang der Nebendrüse; *gAG* gemeinsamer Ausführgang; *K* Sekretkanal; *HD* Hauptdrüse; *ND* Nebendrüse; *DZ* Deckzellen (schraffiert); *KZ* Kanalzellen; *HZ* Hauptzellen (punktiert). *2—11* ungefähre Schnittführung der folgenden elektronenmikroskopischen Abbildungen. (Die Verzweigungen des Sekretkanals im Bereich der Hauptzellen der Hauptdrüse sind nach unseren Untersuchungen *nicht* vorhanden)

Aussagen zu und deckten interessante Feinstrukturen im Bereich der Kanalzellen auf. Nachdem die Bildung des Sekrets in den Hauptzellen (Moericke u. Wohlfarth-Bottermann 1960), die Feinstruktur der Deckzellen der Hauptdrüse (Wohlfarth-Bottermann u. Moericke 1959) und die auffallenden Strukturen der Nebendrüse (Wohlfarth-Bottermann u. Moericke 1960) beschrieben wurden, sollen nun die Befunde über die Ausführgänge der Speicheldrüsen dargelegt werden. Es zeigte sich, daß der Ableitung des Prosekrets aus den Drüsenzellen weitaus kompliziertere morphologische Gegebenheiten zugrunde liegen, als lichtmikroskopisch vermutet werden konnte.

Material und Technik

Objekte und Methoden waren wiederum die gleichen wie in den vorangehenden Arbeiten; es sei auf die I. Mitteilung im Rahmen der Reihe in dieser Zeitschrift verwiesen (Moericke u. Wohlfarth-Bottermann 1960). Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und des *Bundeskanzleramtes* durchgeführt. Frau K. Joppen und Frau B. Koeppen-Lesche danken wir wiederum für ihre technische Assistenz, Frau M. Sauernheimer für die fototechnischen Arbeiten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen

In einem Übersichtsbild wird in Abb. 2 zunächst bei schwacher Vergrößerung der Ausführgang einer Hauptdrüse (etwas schräg geschnitten) dargestellt. Im folgenden wird bei jeder elektronenmikroskopischen Abbildung auf Abb. 1 verwiesen, in die jeweils die ungefähre Schnittlage und Schnittführung eingetragen sind. — Eine derbe Basalmembran (*BM*) umgibt ebenso wie die Hauptdrüse und die Nebendrüse auch den Ausführgang allseitig und lückenlos und grenzt ihn zur Leibeshöhle ab. Innerhalb des Ausführganges (Abb. 2) sind 3 verschiedene Kanalszellen zu erkennen. Für die Kanalzelle ist ein sehr locker strukturiertes Cytoplasma charakteristisch, in dem sich relativ kleine Mitochondrien (*M*) finden. Die charakteristische Feinstruktur des Cytoplasmas wird an Hand anderer Abbildungen bei stärkerer Vergrößerung besprochen. Im Übersichtsbild sei schon auf das Vorkommen größerer, membranumhüllter Blasen (*Bl*) hingewiesen. Als Inhalt dieser Blasen tritt eine feinfädige Substanz in Erscheinung, die durch ihre etwas größere Dichte im Vergleich zum übrigen Cytoplasma auffällt. Die die einzelnen Kanalzellen trennenden Zellmembranen (*ZM*) sind gegeneinander unregelmäßig verzahnt [vgl. Fawcett (1958), Policard u. Baud (1958)], so daß scheinbar voneinander abgegrenzte Bezirke entstehen. Regelmäßige Einstülpungen von Zellmembranen im basalen Teil der Zellen am Drüsenrand — etwa wie bei der Nebendrüse (Wohlfarth-Bottermann u. Moericke 1960) — kommen nicht vor. Die auffallendste Struktur des Ausführganges stellt der eigentliche Sekretkanal (*SK*) und besonders der ihn umgebende Cytoplasmabezirk dar, also die apikalen Bereiche der einzelnen Kanalzellen. Der Sekretkanal besitzt eine starke Wandung (etwa 0,1 μ). Sein Lumen erscheint (in Abb. 2) mit einer schwach kontrastierten Substanz gefüllt. Der Sekretkanal wird von regelmäßig angeordneten Membraneinfaltungen umgeben, die scheinbar unmittelbar an der peripheren Wand des Sekretkanals ansetzen. Es handelt sich, wie später bei stärkerer Vergrößerung belegt wird, um *kranzartig angeordnete Falten der Zellmembran im apikalen Bereich der Kanalzellen*, wo immer diese den Sekretkanal begrenzen. Der Sekretkanal liegt also in allen Fällen *interzellulär*.

Abb. 3 gibt über den feineren Aufbau der apikalen Zellmembranfalten der Kanalzellen bei stärkerer Vergrößerung Aufschluß. Die Lokalisation des Schnittes zeigt Abb. 1. Es ist der Ausführgang der Nebendrüse. Bei Abb. 3 handelt es sich um eine Ausschnittsvergrößerung, auf der nur ein Teil des „Faltenkranzes" dargestellt ist. Der Sekretkanal (*SK*) befindet sich in der linken unteren Bildecke. Man erkennt nun deutlich, daß die apikale Zellmembran der Kanalzellen durch zahlreiche Membranfalten einen „faltenkranzähnlichen" Komplex rund um den eigentlichen Sekretkanal bildet. Die dem Sekretkanal unmittelbar benachbarten Faltenränderr, ihre apikalen „Umschlagstellen", sind beim Ausführgang der Nebendrüse immer in sich geschlossen, haben also keinen Kontakt mit der Wandung des Sekretkanals, wie dies beim Ausführgang der Hauptdrüse (Abb. 2) der Fall zu sein schien. Auf den ersten Blick hat dieser „Faltenkranz" eine gewisse Ähnlichkeit mit einem „Bürstensaum", dessen Einzelelemente, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen in zahlreichen Fällen, insbesondere bei Nieren- und Darmzellen gezeigt haben, aus den sog. „*Mikrovilli*" bestehen (vgl. Fawcett 1958). Die Elemente des Faltenkranzes sind jedoch keine Mikrovilli, also *keine fingerförmigen* Ausstülpungen, sondern flächig kammartige Falten der Zellmembran. Hinweise hierfür ergibt schon Abb. 3, weil keine kreisrunden Querschnitte auftreten. Die flächige, kammartige Natur dieser Zellmembranfaltungen, die wir in Gegenüberstellung zum Mikrovillus als *Mikrosinus* bezeichnen möchten, kann an Hand der Auswertung von Serienschnitten sichergestellt werden (vgl. Abb. 9). Gresson u. Threadgold (1959) beschrieben bereits bei Fasciola hepatica in geringem Ausmaße eine einseitige Verbreiterung von Mikrovilli, die als Übergang zu den hier beschriebenen Falten aufgefaßt werden kann.

Wie bereits erwähnt, liegt damit der eigentliche Sekretkanal *zwischen* den Kanalzellen, also interzellulär. Durch die Ausbildung des Faltenkranzes, den man als „*Corona sinuosa*" bezeichnen könnte, entstehen in der Umgebung des Sekretkanals zwischen den beiden Zellmembranen großflächige interzelluläre Räume. Diese sind im allgemeinen sehr eng und daher nur bei starken Vergrößerungen und dort, wo sie exakt quergetroffen sind, zu erkennen; an vielen Stellen erweitert sich aber dieser interzelluläre Raum zu größeren Lumina (*IR* in Abb. 3), und zwar dadurch, daß die beiden ihn begrenzenden Zellmembranen auseinanderweichen. Besonders der der Zelle zugewandte Teil des Faltenkranzes (Abb. 4) zeigt solche Erweiterungen des Interzellular-Raumes.

Hier, also unmittelbar an der „Peripherie des Faltenkranzes", sieht man häufig eine auffallende Ansammlung von kleinen Mitochondrien (Abb. 4, *M*), die außerordentlich „dicht gepackt" sind. Im oberen Teil von Abb. 4 finden wir den Anschnitt einer Nebendrüsenzelle, die an eine Kanalzelle angrenzt (im Bild unten der periphere Bezirk eines Faltenkranzes dieser Kanalzelle). Die Zellmembranen (*ZM*) von Drüsenzelle und Kanalzelle sind verzahnt.

Wie Abb. 5 zeigt, ist der Inhalt des Sekretkanals verschieden, je nachdem in welchem Teil der Speicheldrüsen er geschnitten wird. Während Abb. 5a den Sekretkanal im Ausführgang der Nebendrüse darstellt, handelt es sich bei Abb. 5b um den Sekretkanal im Ausführgang dicht an der Hauptdrüse (Schnittführung vgl. Abb. 1). Innerhalb der Nebendrüse und ihrem Ausführgang erscheint der Kanal regelmäßig eine Flüssigkeit zu beinhalten, deren Bestandteile elektronenoptisch nicht oder kaum darzustellen sind. Es zeigt sich allenfalls eine sehr

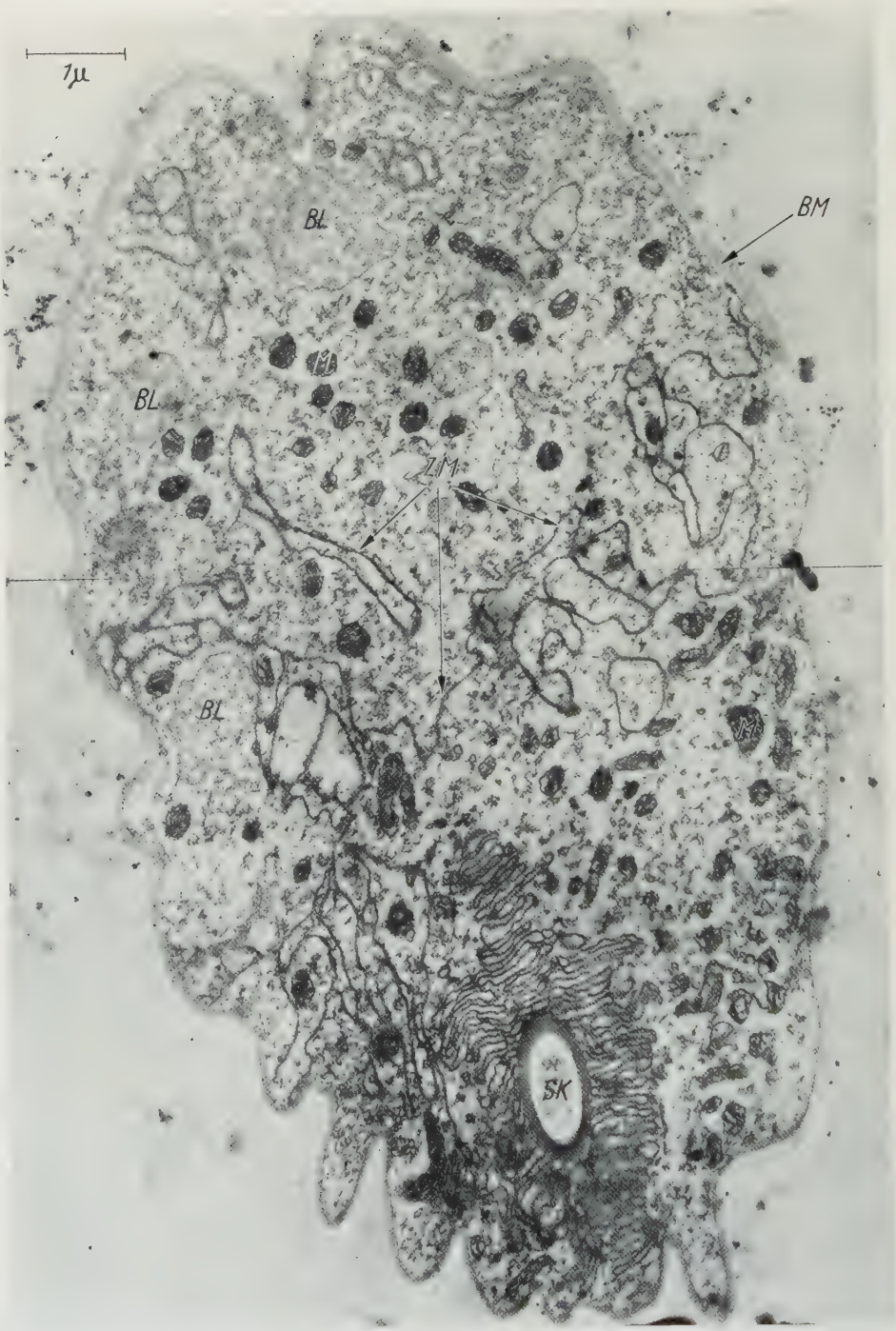


Abb. 2. Querschnitt durch den Ausführgang einer Hauptdrüse (Schnittführung vgl. Abb. 1). Das Übersichtsbild zeigt, daß der Ausführgang allseitig von einer derben Basalmembran (*BM*) umschlossen ist. Anschnitte von 3 Kanalzellen mit lockerem Cytoplasma und zahlreichen kleinen Mitochondrien. Im Cytoplasma finden sich membranumhüllte Blasen (*Bl*), deren Inhalt etwas dichter strukturiert ist als das Cytoplasma. Zellmembranen (*ZM*) ineinander verzahnt. Der Sekretkanal (*SK*) mit starker Wandung und schwach kontrastiertem Inhalt. Um den Sekretkanal auffällig gefaltete Membranstrukturen, die an der Wandung des Sekretkanals anzusetzen scheinen (vgl. Abb. 5b). Der Sekretkanal liegt nur scheinbar in einer Zelle, tatsächlich jedoch interzellulär (vgl. insbesondere Abb. 8a). Elektronenoptisch 6500:1; Endvergrößerung 13 500:1

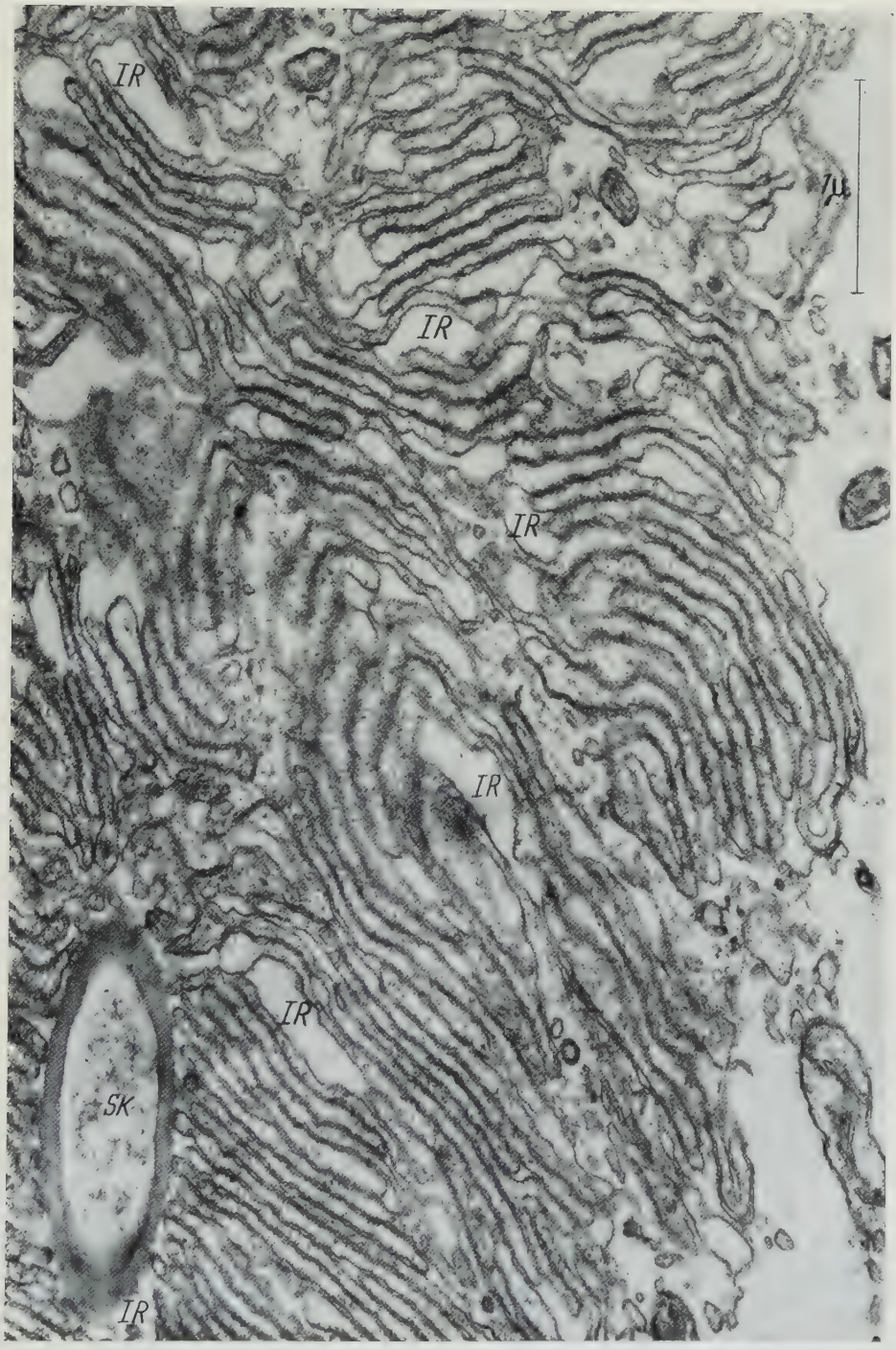


Abb. 3. Querschnitt durch den Ausführgang der Nebendrüse (Schnittführung vgl. Abb. 1). Ausschnittvergrößerung mit Sekretkanal (*SK*) und dem ihn umgebenden „Faltenkranz". Die apikale Zellmenbran der Kanalzellen bildet durch zahlreiche Zellmembraneinfaltungen einen faltenkranzähnlichen Komplex, der den Kanal allseitig umgibt (*„Corona sinuosa"*). Die morphologische Einheit dieses Faltenkranzes ist in Gegenüberstellung zum fingerförmigen *Mikrovillus* der flächig-kammartige Zellfortsatz (*„Mikrosinus"*, vgl. Abb. 12, *a*). Innerhalb des Faltenkranzes sind kanalnahe und kanalferne Interzellularräume (*IR*) sowie enge Interzellularfugenräume zu unterscheiden (genaue Markierung s. Schema Abb. 12, *e*, *f* und *h*). Die dem Sekretkanal zugewandten Faltenränder sind in sich geschlossen und haben insofern keinen Kontakt mit der Wandung des Sekretkanals. E.O. 6500:1; E.V. 29000:1

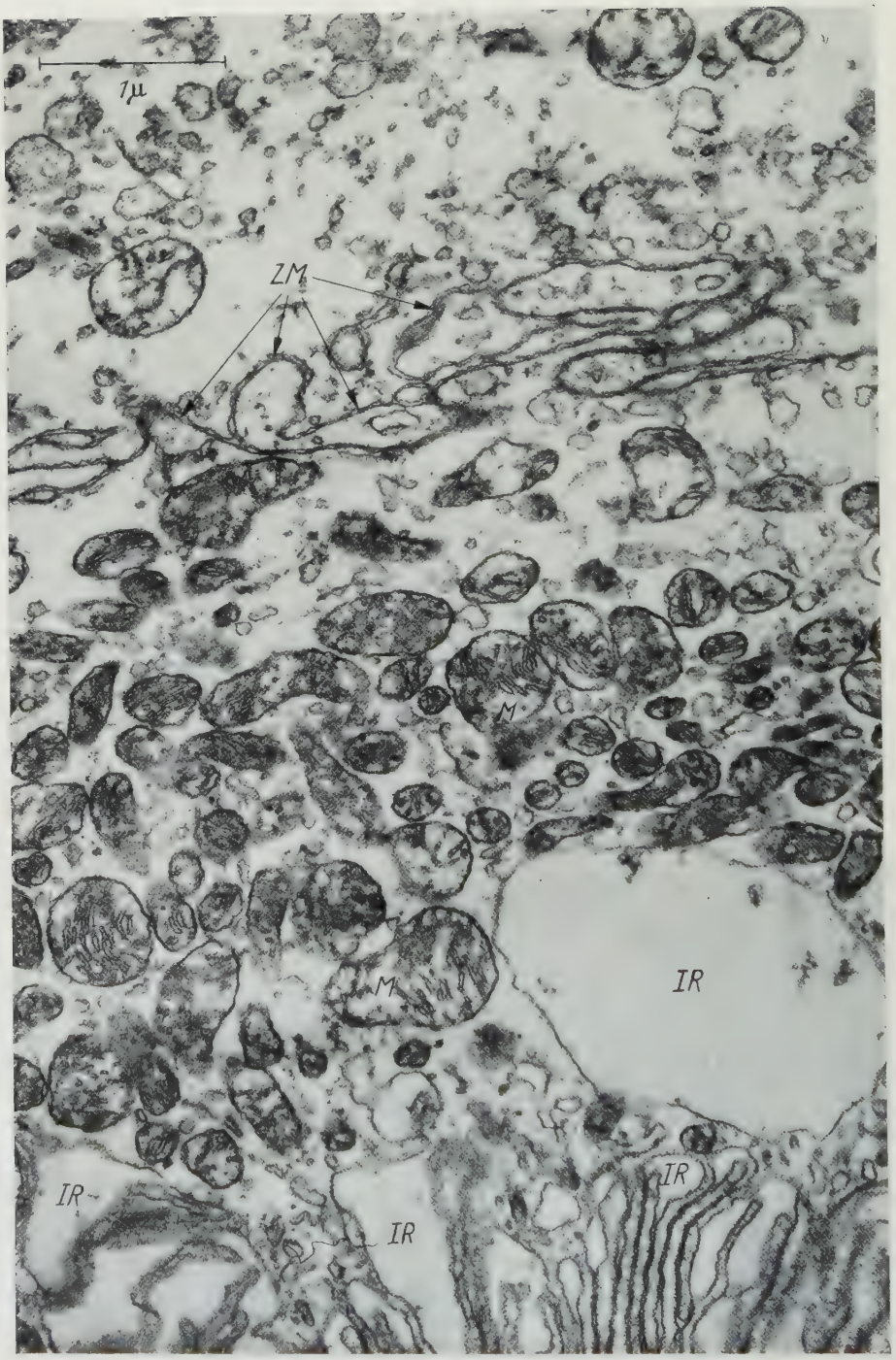


Abb. 4. Anschnitt einer Kanalzelle (im Bild unten) und einer angrenzenden Nebendrüsenzelle (im Bild oben), Schnittführung vgl. Abb. 1. Zellmembranen (*ZM*) der beiden Zellen miteinander verzahnt. Im Bild ganz unten: peripherer Teil des Faltenkranzes mit großen Interzellulär-Räumen (*IR*). Die *IR*-Markierung ganz rechts unten im Bild weist auf eine Stelle hin, wo sich eine Interzellularfuge besonders deutlich zu einem kanalfernen Interzellularraum erweitert. Beachte die Anhäufung von Mitochondrien (*M*) in unmittelbarer Umgebung des Faltenkranzes. E.O. 6500:1; E.V. 25500:1

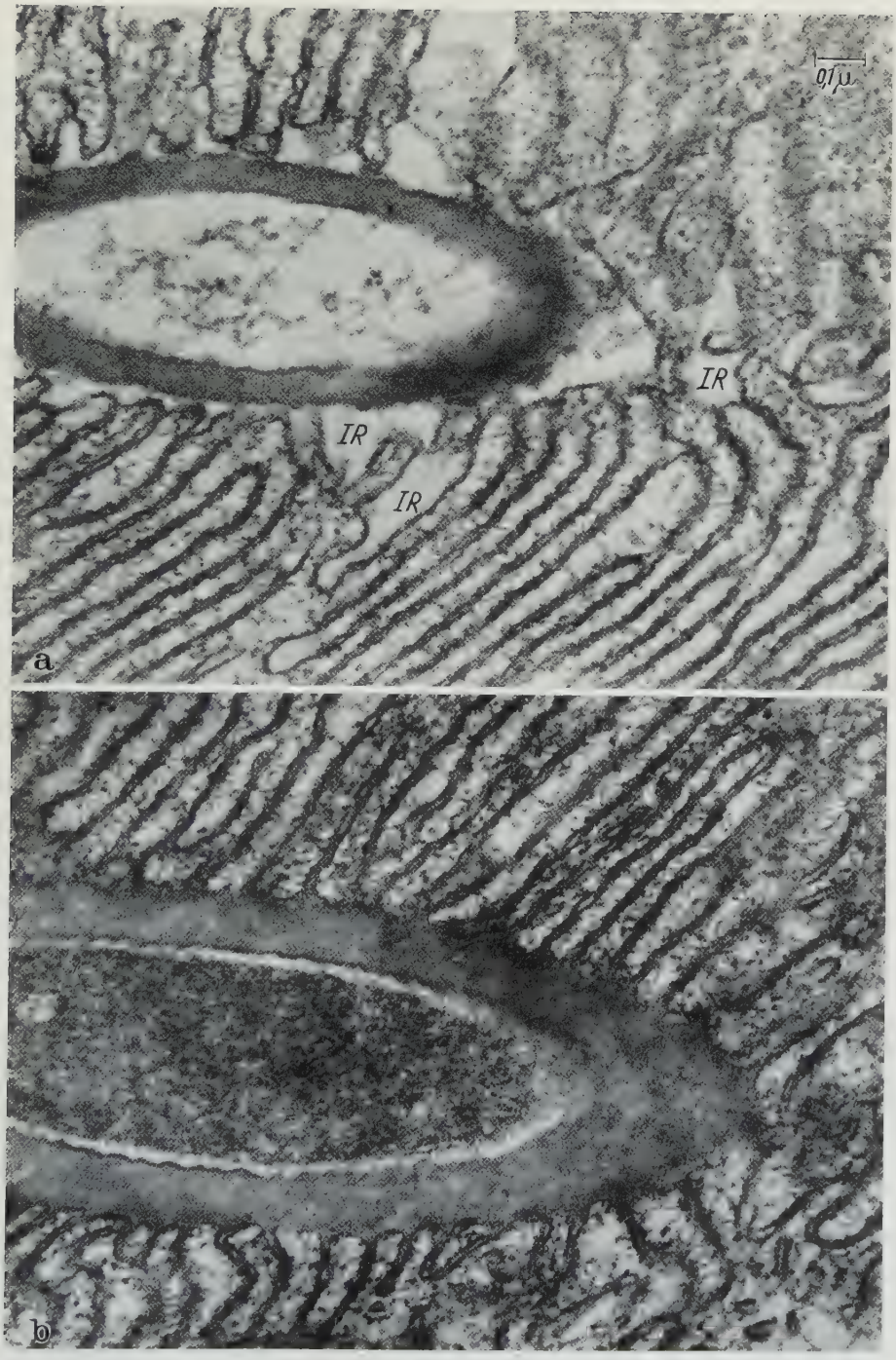


Abb. 5. a Sekretkanal im Ausführgang der Nebendrüse (Schnittführung vgl. Abb. 1). b Sekretkanal im Ausführgang dicht an der Hauptdrüse (Schnittführung vgl. Abb. 1). Während der Sekretkanal im Ausführgang der Nebendrüse elektronenoptisch mehr oder weniger leer erscheint (Abb. 5a), ist dieser im Bereich der Hauptdrüse mit einer elektronenoptisch stark kontrastierbaren Substanz gefüllt. Beachte, daß die dem Sekretkanal zugewandten Faltenränder in Abb. 5a (wie in Abb. 4) zumeist einen gewissen Abstand von der Wandung des Sekretkanals halten, während sie in Abb. 5b unmittelbar an der Wandung des Sekretkanals anzusetzen scheinen. Bei Abb. 5a große, elektronenoptisch leer erscheinende Interzellular-Räume (*IR*), die in Abb. 5b fehlen. E.O. 6800:1; E.V. 65 500:1

Abb. 6. Anschnitt einer Kanalzelle am distalen Ende des Sekretkanals in der Nebendrüse mit angrenzenden Nebendrüsenzellen (im Bild oben und rechts). Schnittführung vgl. Abb. 1. *ISK* Intrazelluläres Sekretkanälchen („Schlauchkomplex") in einer Nebendrüsenzelle. *RBL* Randblase eines intrazellulären Sekretkanälchens in einer Nebendrüsenzelle. Diese Randblase scheint in offener Verbindung (*V*) mit dem Lumen des Sekretkanals (*SK*) zu stehen. Der Sekretkanal ist stark erweitert

lockere, feinfädige und kontrastarme Struktur (Abb. 5a). Im Ausführgang der Hauptdrüse dagegen ist der Sekretkanal meist mit einer elektronenoptisch sehr dichten und kontrastreichen Substanz erfüllt. Noch interessantere Unterschiede ergeben sich bei genauer Betrachtung der dem Sekretkanal unmittelbar zugewandten Ränder des Faltenkranzes, also an den Stellen, an denen jeweils ein Mikrosinus der Wand des Sekretkanals anliegt. In Abb. 5a halten die Ränder der Falten einen gewissen Abstand von der Wand des Sekretkanals, während sie in Abb. 5b unmittelbar an dieser Wandung anzusetzen scheinen. Während sich in Abb. 5a die bereits an Hand von Abb. 3 und 4 beschriebenen Erweiterungen der interzellularen Räume (*IR*) nachweisen lassen, fehlen diese in Abb. 5b. Das unmittelbare Ansetzen der Faltenränder an der Wandung des Sekretkanals läßt sich aber auch so deuten, daß der interzellulare Raum unmittelbar um den Sekretkanal herum in Abb. 5a, also im Bereich der Nebendrüse, elektronenoptisch leer erscheint, während er in Abb. 5b, also im Bereich der Hauptdrüse, mit einer elektronenoptisch stark kontrastierenden Substanz erfüllt ist, so daß die Abgrenzung zur Wandung nicht mehr erkennbar ist.

Abb. 6 zeigt, wie sich der Sekretkanal an seinem distalen Ende im Innern der Nebendrüse (vgl. Abb. 1) stark erweitert und in seinem Aufbau verändert. Seine Wandung besteht hier nicht mehr aus einer kompakten, elektronenoptisch strukturlosen, derben Schicht, die mit einer Basalmembran verglichen werden könnte, sondern aus mindestens 5 parallel angeordneten Schichten von Doppelmembranen. Der Faltenkranz ist nur schwach ausgebildet im Vergleich zu den anderen, bisher beschriebenen Bereichen der Ausführgänge. Erweiterte Interzellularräume, wie sie z. B. in Abb. 3 und 4 zu erkennen sind, fehlen völlig. Im Gegensatz zu seinem sonstigen Verlauf in der Nebendrüse gleicht der Faltenkranz des Sekretkanals an seinem distalen Ende, tief im Innern der Nebendrüse, also mehr dem des Ausführganges der Hauptdrüse. Von besonderer Wichtigkeit ist, daß sich die Doppelmembranstrukturen, die hier die Wandung des Sekretkanals bilden, an einer Stelle (rechts im Bild) zum Cytoplasma der Kanalzelle hin zu öffnen scheinen. Dies ist charakteristisch für das Ende des Sekretkanals in der Nebendrüse. Verschiedene, hier nicht gezeigte Aufnahmen belegen, daß diese Öffnung des Sekretkanals zum Cytoplasma der Kanalzellen hin fast die Hälfte des Kanalumfanges einnehmen kann. Das Lumen des Sekretkanals ist mit einer feinfädigen Substanz gefüllt, die in ihrer Struktur dem Inhalt der Randblasen (*RBl*) der intrazellulären Sekretkanälchen (*ISK*) in den Zellen der Nebendrüse (vgl. Wohlfarth-Bottermann u. Moericke 1960) entspricht. Am oberen und rechten Bildrand in Abb. 6 sind nämlich Nebendrüsenzellen angeschnitten. Man erkennt, daß die Zellmembranen (*ZM*) der Kanalzellen und der Nebendrüsenzellen jeweils an den Faltenkranz hinführen.

Die Abb. 7a und b stellen Serienschnitte von Kanalzellen im Bereich der Hauptzellen der Hauptdrüse dar (Schnittlage s. Abb. 1). Die verschiedenen Kanalzellen sind mit *KZ 1*, *2* und *3* gekennzeichnet. In der linken unteren Ecke

(distales Ende!, vgl. Abb. 1). Seine Wandung besteht aus 5 Doppelschichten von Membranen. Der Faltenkranz ist nur schwach entwickelt, die Faltenränder setzen unmittelbar an der peripheren Doppelschicht der Zellmembran an. *i* Scheinbare Verschmelzung zweier Zellmembraneinfaltungen, Deutung siehe Abb. 12 und S. 43. Beachte die Übereinstimmung der feinfädigen Struktur im Lumen des Sekretkanals (*SK*) und der Randblase (*RBL*). Die Zellmembranen der Kanalzellen und Nebendrüsenzellen (*ZM*) sind wechselseitig verzahnt (Doppelpfeil) und führen zum äußeren Rand des Faltenkranzes. *PSG* Prosekretgranulum in einer Nebendrüsenzelle. E.O. 6500:1; E.V. 21000:1

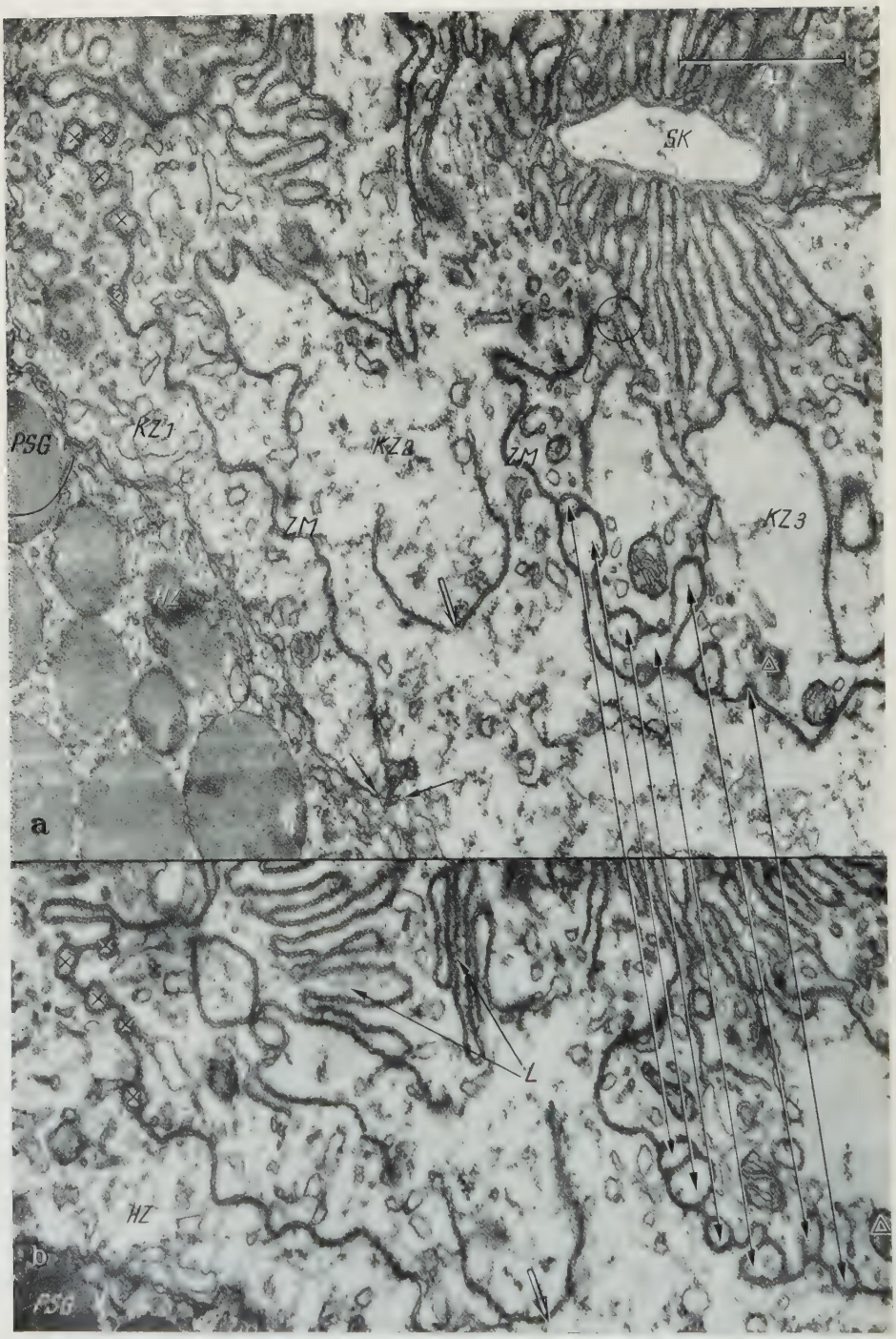


Abb. 7a u. b. Serienschnitte (a und b) von Kanalzellen (*KZ 1—3*) im Bereich der Hauptzellen der Hauptdrüse (Schnittführung s. Abb. 1). Links unten im Bild jeweils eine Hauptzelle (*HZ*) mit Prosekretgranula (*PSG*). Der Sekretkanal (*SK*) ist dünnwandig und elektronenoptisch leer. Der Faltenkranz ist relativ schwach ausgebildet. Die Ränder des Mikrosinus haben keinen unmittelbaren Kontakt mit der Kanalwandung, so daß zwischen Kanalwandung und Faltenrand ein interzellulärer Raum verbleibt. Bei den kurzen, einfachen Pfeilen stoßen 2 Kanalzellen und 1 Hauptzelle aneinander. Die Zellmembranen (*ZM*) zwischen den Kanalzellen 2 und 3 (*KZ 2* und *KZ 3*) sind in ihrem Verlauf bis an den Faltenkranz zu verfolgen (vgl. Kreismarkierung). Verzahnungen im lateralen Bereich der Zellen sind häufig (*L*). Die Kreuze und die von Bild zu Bild gehenden Pfeile weisen auf „membranumhüllte Gebilde" im Interzellularraum hin (Deutung s. S. 43 u. Abb. 12, *b*). Der Doppelpfeil weist auf eine anscheinend isoliert liegende, halbkreisförmige Doppelmembran im Cytoplasma (vgl. S. 45).
E.O. 5900:1; E.V. 23000:1

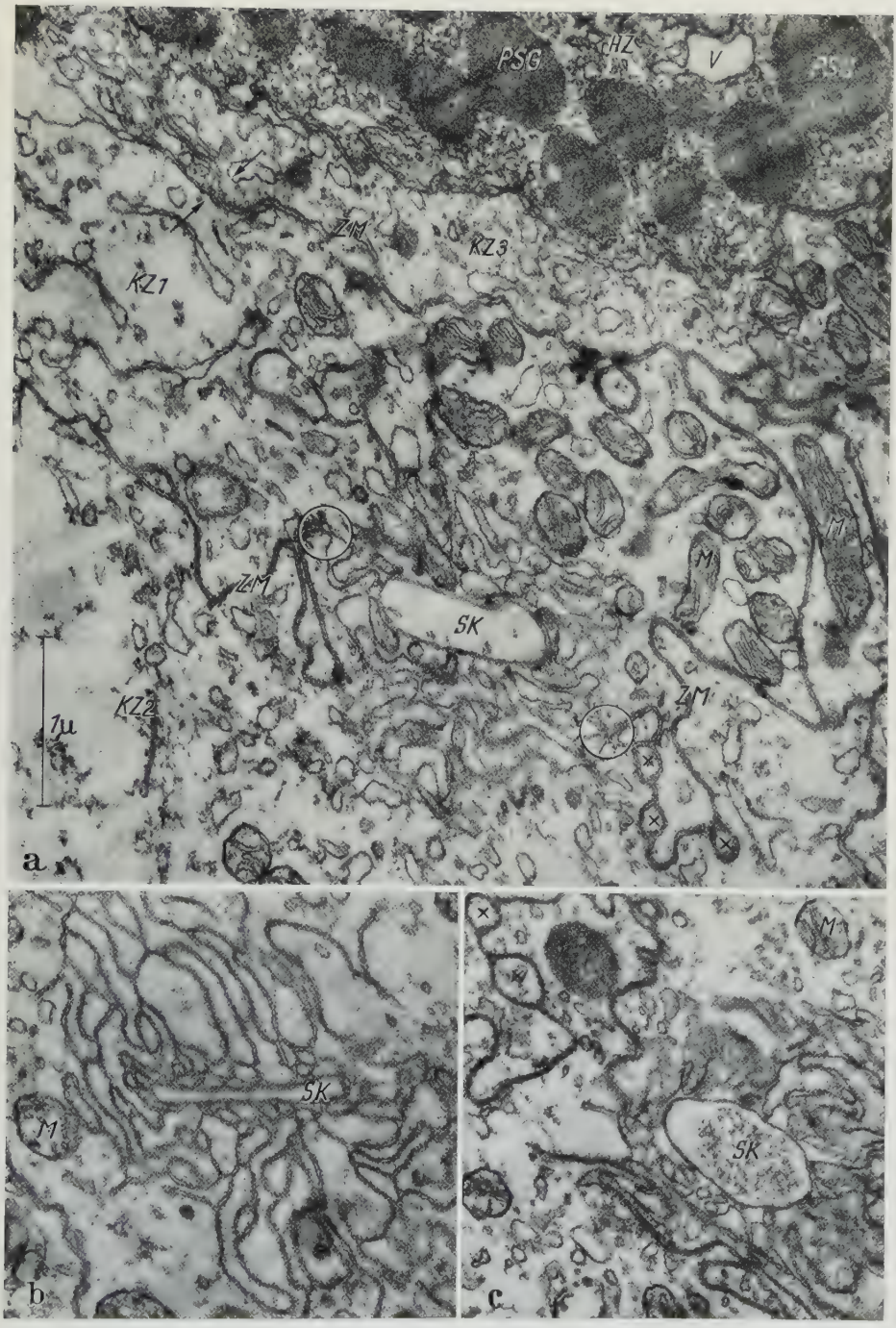


Abb. 8. a und c: Sekretkanal im Bereich der Hauptzellen der Hauptdrüse im distalen Bereich (Schnittführung vgl. Abb. 1). Faltenkranz um den Sekretkanal (*SK*) schwach und unregelmäßig ausgebildet. *HZ* Hauptzelle mit Prosekretgranula (*PSG*) und Vakuole (*V*). 3 Kanalzellen (*KZ 1—3*) mit Zellmembranen (*ZM*), die im Gebiet der Kreismarkierungen in den Faltenkranz übergehen und sich zu einem erweiterten Interzellularraum öffnen (s. besonders linker Kreis). Bei der Pfeilmarkierung stoßen 2 Kanalzellen und 1 Hauptzelle aneinander. In der Fortsetzung des Interzellularraumes befinden sich wie in Abb. 7 und 8c „membranumhüllte Gebilde" (Kreuzmarkierungen). *M* Kleine Mitochondrien. b: Verästelung des Sekretkanals im Bereich der Deckzellen. (Schnittführung vgl. Abb. 1.) Sekretkanal englumig mit schwach ausgebildetem Faltenkranz. E.O. 5900:1; E.V. 23000:1

jedes Bildes findet sich der Anschnitt einer Hauptzelle der Hauptdrüse, die leicht an Hand der typischen Prosekretgranula (*PSG*) dieser Zellen (vgl. Moericke u. Wohlfarth-Bottermann 1960) erkannt werden kann. Der Sekretkanal (*SK*) ist auffallend dünnwandig und erscheint elektronenoptisch leer. Sein Faltenkranz ist verhältnismäßig klein. Ein interzellulärer Raum zwischen Kanalwandung und den Rändern des Faltenkranzes ist zu erkennen. Die Identifizierung der beiden Serienschnitte ist an den durch Kreuzmarkierungen sowie an den von Bild zu Bild gehenden Pfeilmarkierungen leicht durchzuführen. Die kurzen, einfachen Pfeile weisen auf eine insofern besonders interessante Stelle, als hier 2 Kanalzellen, nämlich *KZ 1* und *KZ 2* mit einer Hauptdrüsenzelle (*HZ*) zusammenstoßen. Die Zellmembranen (*ZM*), die die Kanalzellen *KZ 2* und *KZ 3* begrenzen, sind auf dieser Abbildung in ihrem Verlauf bis in den Faltenkranz hinein zu verfolgen. Solche Zellmembranen münden z. B. an der durch Kreismarkierung in Abb. 7a gekennzeichneten Stelle in den Faltenkranz ein. An Hand der Abb. 7a und b soll besonders auf Erweiterungen der Interzellularspalte hingewiesen werden, die „membranumhüllte Gebilde" enthalten. Diese sind jeweils in beiden Serienschnitten an den durch Kreuzmarkierung gekennzeichneten Stellen zu finden. Die von Bild zu Bild gehenden Pfeile weisen ebenfalls auf solche bemerkenswerten Strukturen hin. Ihre Bedeutung wird im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse zu besprechen sein. Der Doppelpfeil zeigt jeweils Serienschnitte einer anscheinend isoliert liegenden „Doppelmembran" im Cytoplasma.

In Abb. 8 werden verschiedene Strukturaspekte des Sekretkanals (*SK*) im Bereich der Hauptzellen der Hauptdrüse (a und c) sowie einer Verästelung des Sekretkanals im Bereich der Deckzellen (b) dargestellt (zur genauen Lage der Schnitte vgl. Abb. 1). In allen Fällen sind die Faltenkränze nur andeutungsweise entwickelt. Die Anordnung der einzelnen Falten ist zudem sehr unregelmäßig. Abb. 8a zeigt 3 Kanalzellen (*KZ 1—3*), von denen *KZ 3* an eine Zelle der Hauptdrüse (*HZ*) mit Prosekretgranula (*PSG*) grenzt.

Innerhalb der Hauptdrüsenzelle ist eine charakteristische Vakuole (*V*) zu erkennen, wie sie im apikalen Bereich dieser Zellen häufig beobachtet wird (vgl. Moericke u. Wohlfarth-Bottermann 1960). Bei der Pfeilmarkierung grenzt die Hauptzelle (*HZ*) an die Kanalzellen *KZ 1* und *KZ 3*. Der Interzellularspalt, der durch die Zellmembranen *KZ 1* und *KZ 3* gebildet wird, setzt sich wiederum bis in den Faltenkranz fort und mündet an der rechten Kreismarkierung in diesen ein. Die linke Kreismarkierung zeigt eine entsprechende Stelle. Die Kreuzmarkierungen in Abb. 8a und e weisen wiederum auf die bereits in Abb. 7 beschriebenen „membranumhüllten Gebilde" in den Interzellularen hin. Der Sekretkanal erscheint im Gebiet seiner Verästelungen im Bereich der Deckzellen (Abb. 8b) auffallend englumig.

Schneidet man den Sekretkanal im Bereich der Deckzellen unmittelbar distal vor seiner Gabelung (Abb. 9, vgl. hierzu Abb. 1), so findet man die Wandungen der Sekretkanäle (*SK*) besonders kontrastreich und anscheinend mehrschichtig. Das Lumen erscheint in diesem Bereich immer dicht gefüllt (vgl. auch Abb. 11). Im Bild rechts unten ist ein Serienschnitt eingeblendet. Die Kreismarkierungen weisen auf identische Bereiche in beiden Schnitten, in denen die große Tiefenausdehnung der Membranfalten nachweisbar ist. Es handelt sich um relativ weit voneinander entfernte Serienschnitte. Im Bereich der T-Markierung sind die

Membranfalten flächig, d. h. tangential geschnitten. Die außerordentlich dichte Packung der Membranfalten ist auf Abb. 9 besonders bemerkenswert. Der Abstand zwischen den beiden jeweils einander gegenüberliegenden Zellmembranflächen, d. h. der Abstand der einzelnen Falten ist konstant, Erweiterungen in Form von ausgesprochenen Lumina (wie z. B. in Abb. 3 und 4) fehlen.

Abb. 10 vereinigt verschiedene Strukturaspekte des Sekretkanals und des umgebenden Faltenkranzes, und zwar 10a und c im gemeinsamen Ausführgang und 10b im Ausführgang dicht an der Hauptdrüse. Die ungefähre Schnittlage ist wiederum in Abb. 1 verdeutlicht. Als Besonderheit erscheint in Abb. 10a, daß einige Interzellularräume des Faltenkranzes stark erweitert und mit einer elektronenoptisch diffusen und deutlich kontrastierten Substanz gefüllt sind (Pfeilmarkierungen Abb. 10a). Der Inhalt des Sekretkanals kann, wie Abb. 10a und c belegen, entweder ganz unkontrastiert oder aber sehr stark kontrastiert sein. Auch im Ausführgang der Hauptdrüse sind beide Möglichkeiten gegeben (vgl. Abb. 2, 5b und 10b).

Die mögliche Bedeutung der interzellulären Räume für die Sekretableitung wird in Abb. 11 an Hand eines Übersichtsbildes bei schwacher Vergrößerung dargestellt. Es handelt sich um einen Sekretkanal (*SK*) mit Faltenkranz im Bereich der Deckzellen (Schnittlage s. Abb. 1). Zwischen diesen Deckzellen (*DZ*) und den Kanalzellen *KZ 1* und *KZ 2* findet sich ein besonders stark erweiterter interzellulärer Raum (*IR*), der sich entlang der vorgenommenen Pfeilmarkierung bis zu einem weiteren, größeren Interzellularspalt (Kreuzmarkierung) fortsetzt und andererseits von der mit Doppelpfeil markierten Stelle aus entlang der Pfeilmarkierung, der Grenze zwischen den beiden Kanalzellen *KZ 1* und *KZ 2*, in den Faltenkranz einmündet. Die Einmündungsstelle ist durch Kreismarkierung angezeigt.

Diskussion der Befunde

Wie unsere Untersuchungen zeigen, ist das ganze sekretableitende System — sowohl in den Drüsenlappen selbst wie in ihren Ausführgängen — im Wesentlichen einheitlich strukturiert: Der Sekretkanal liegt interzellulär zwischen den Kanalzellen. Die angrenzenden Zellmembranen im apikalen Bereich der Kanalzellen sind rings um den Sekretkanal in zahlreichen, ausgedehnten Falten angeordnet. Um diesen „Faltenkranz" liegen oft in „dichter Packung" kleine Mitochondrien. Jeweils 2 Kanalzellen begrenzende Zellmembranen sind miteinander verzahnt und münden in den Faltenkranz ein. Die Zellmembranen zwischen Drüsen- und Kanalzellen zeigen mehrfach blasige Einstülpungen der Zellmembranen beider Zellen in die Kanalzelle hinein. Das Cytoplasma der Kanalzellen ist sehr locker, membranumhüllte Blasen mit etwas dichterem Inhalt heben sich heraus. In den einzelnen Drüsenteilen erfahren diese Grundstrukturen jeweils gewisse Abwandlungen.

Es besteht nun die Aufgabe, die genannten Strukturen zu deuten und sie in Verbindung zu bringen mit der Grundfrage: wie gelangt das Prosekret aus den Drüsenzellen in den Kanal und was geschieht mit diesem Prosekret im Kanal selbst ? Es erscheint notwendig, die 3 Drüsenteile getrennt zu betrachten, zuvor aber die Frage nach der *Bildung des Faltenkranzes* zu behandeln.

Die lateralen Zellgrenzen zwischen 2 Kanalzellen verlaufen vielfach, bevor sie in den Faltenkranz einmünden, mäanderartig: sie sind in auffallender Weise

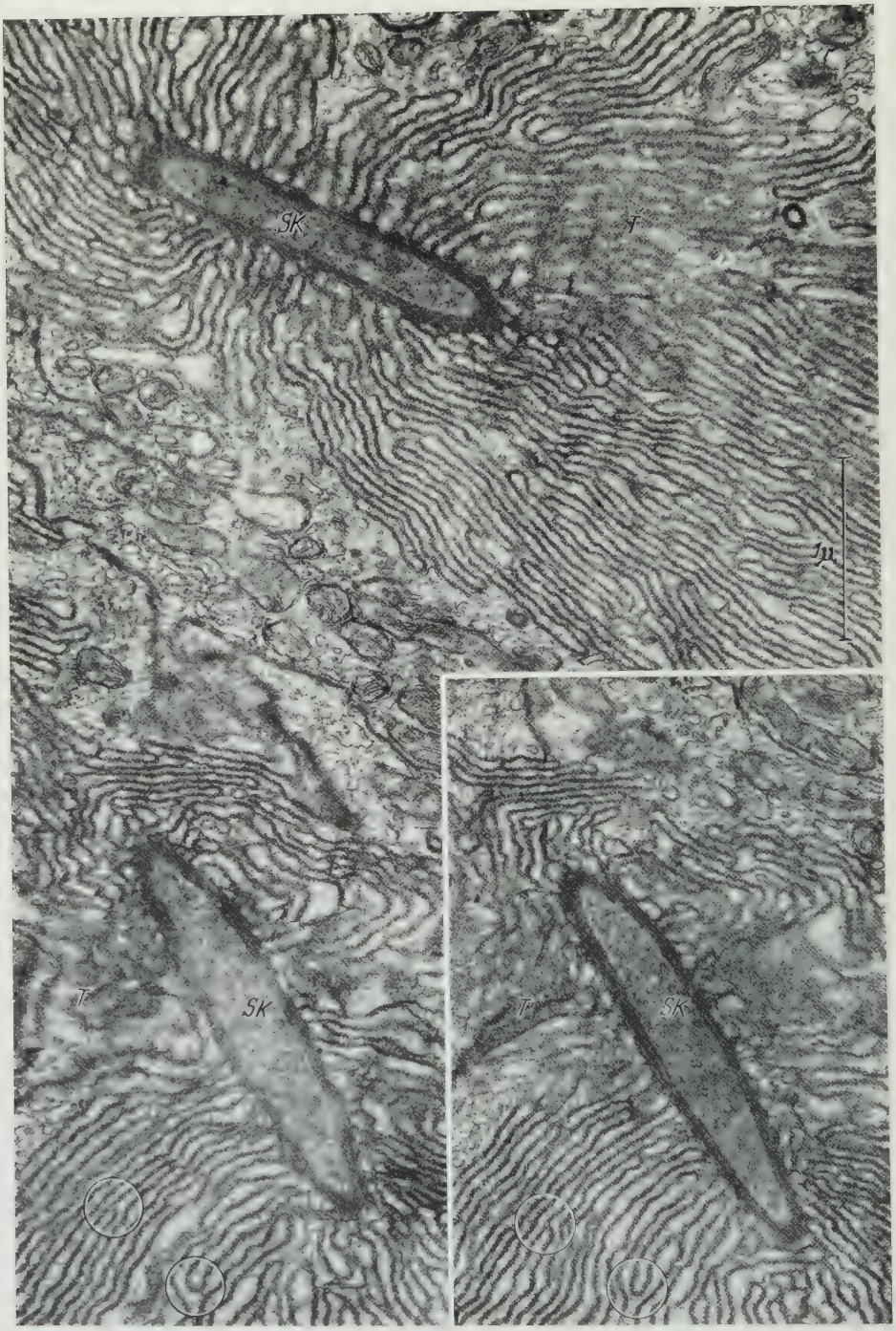


Abb. 9. Querschnitt durch Sekretkanäle (*SK*) im Bereich der Deckzellen, unmittelbar distal vor der Gabelung (Schnittführung vgl. Abb. 1). Einfügung: Serienschnitt. Die Wandung der Sekretkanäle ist besonders kontrastreich und erscheint mehrschichtig. Das Lumen ist mit elektronenoptisch dichter Substanz gefüllt. Die Kreismarkierungen weisen auf identische Bereiche in den beiden (relativ weit voneinander entfernten) Serienschnitten hin. Die Analyse der Serienschnitte ergibt die relativ große Tiefenausdehnung der Membranfalten. Beachte die außerordentlich dichte Packung der Falten, deren Ränder an der Wandung des Sekretkanals ansetzen. *T* Tangential angeschnittene Membranfalten. E.O. 6900:1; E.V. 25 000:1

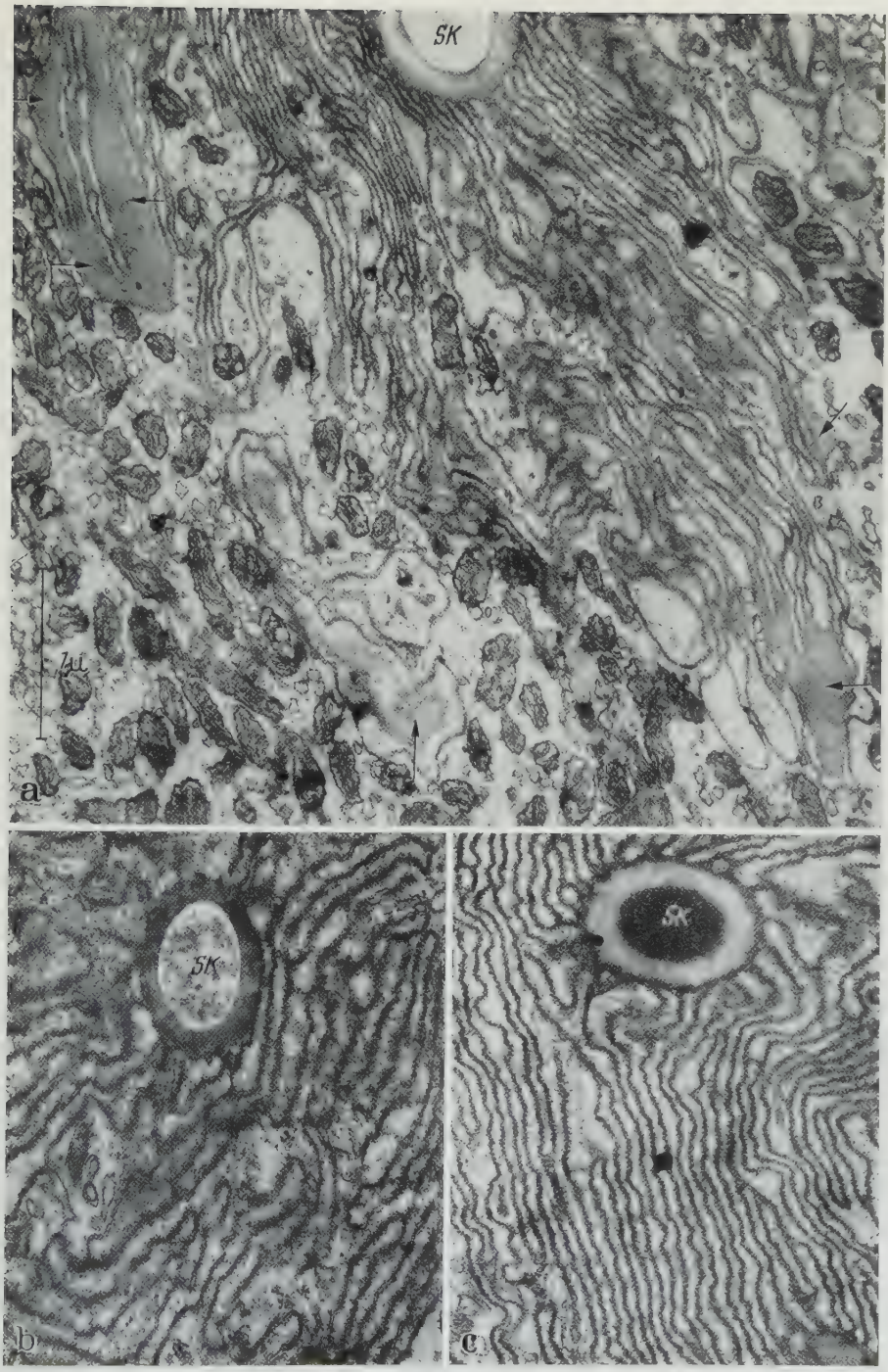


Abb. 10. a und c: Sekretkanal (*SK*) mit Faltenkranz im gemeinsamen Ausführgang (Schnittführung vgl. Abb. 1). Während in Abb. 10a das Lumen des Sekretkanals *leer* erscheint und an den durch Pfeile markierten Stellen in den kanalfernen Interzellularräumen eine elektronenoptisch strukturlose, aber stark kontrastierte Substanz auftritt, ist in Abb. 10c das Lumen des Sekretkanals *gefüllt*. In beiden Fällen scheinen die Ränder der Membranfalten an der Wandung des Sekretkanals anzusetzen. b: Sekretkanal vermutlich im Ausführgang dicht an der Hauptdrüse (Schnittführung vgl. Abb. 1, die Lokalisation ist in diesem Falle jedoch nicht ganz sicher). Beachte, daß das Lumen des Sekretkanals weniger dichte Substanzen zu beinhalten scheint als in Abb. 9 (vgl. Text). E.O. 6900:1; E.V. 23000:1

Abb. 11. Übersichtsbild über den Faltenkranz mit Sekretkanal (*SK*) mit angrenzender Deckzelle (*DZ*), Schnittführung vgl. Abb. 1. Zwischen der Deckzelle und den Kanalzellen (*KZ 1* und *2*) findet sich ein stark erweiterter interzellularer Raum (*IR*), der sich bis zur Kreuzmarkierung fortsetzt. Der Doppelpfeil weist auf die Stelle des interzellularen Raumes, wo Deckzelle und 2 Kanalzellen zusammentreffen und der Interzellularraum sich verengt zur Interzellularfuge zwischen den Zellmembranen der beiden Kanalzellen. Die Pfeilreihe weist auf den Verlauf der beiden Zellmembranen der Kanalzellen *KZ 1* und *KZ 2* hin, die Kreismarkierung auf deren Einmündung in den Faltenkranz. E.O. 6900:1; E. V. 18000:1

verzahnt, eine Erscheinung, die bei Epithelzellen häufig gefunden wurde. Bei oberflächlicher Betrachtung des Faltenkranzes könnte man annehmen, daß diese im Querschnitt schleifenartig aussehenden, verzahnten Membranen sich um den Sekretkanal legten und somit den Faltenkranz bildeten. So würde sich ins-

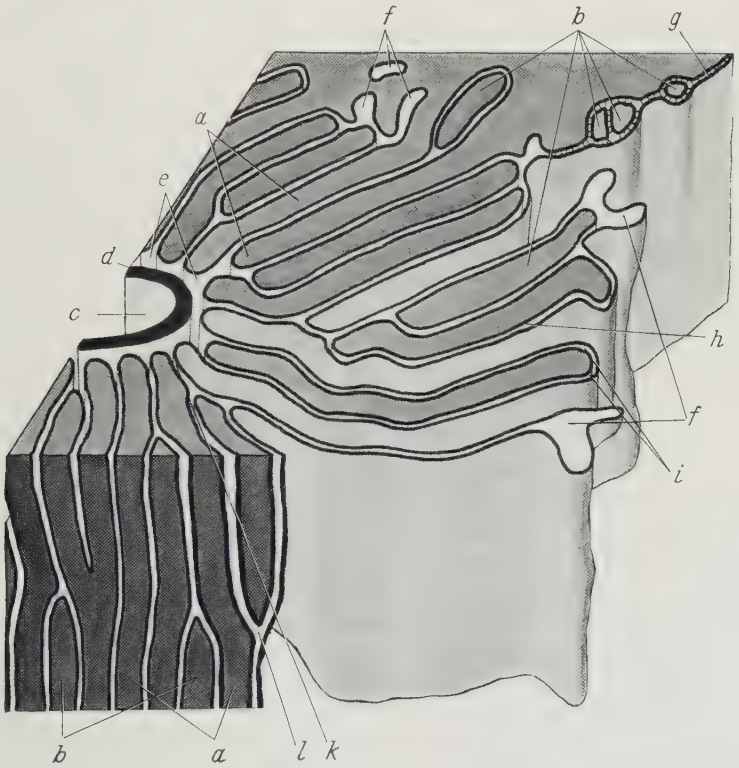


Abb. 12. Schema der Zellmembrandifferenzierungen („Faltenkranz", „*Corona sinuosa*") der Kanalzellen um den Sekretkanal. *a* Normale, leisten- oder kammartige Zellfortsätze („*Mikrosinus*") der anliegenden Kanalzelle in ihrem apikalen Bereich. *b* Verzahnung durch transversal vorstoßende Zellfortsätze der gleichen oder einer anderen Kanalzelle. *c* Lumen des Sekretkanals. *d* Wandung des Sekretkanals. *e* Kanalnaher Interzellularraum zwischen Sekretkanalwandung und Faltenkranz. *f* Kanalferne, erweiterte Interzellularräume im Faltenkranz. *g* „Septierte Desmosomen" (Wood 1959) in Interzellularfugen zwischen 2 verschiedenen Kanalzellen. *h* Interzellularer Fugenraum zwischen den Mikrosinus. *i* Scheinbare Verschmelzung zweier Zellmembraneinfaltungen, die durch Einschachtelung von *b* entstehen. *k* Orte, an denen sich die Zellmembranen zweier benachbarter Mikrosinus zu einer „Doppelmembran" aneinanderlegen. *l* Gabelung der interzellulären Fugenräume, die transversal vorstoßende Zellfortsätze (*b*) begrenzt. (Entwurf und Zeichnung: cand. rer. nat. W. P. Fischer)

besondere die vielfach zu beobachtende paarweise Verbindung zweier Falten (vgl. z. B. Abb. 6i und 12i) leicht erklären lassen. Trotzdem erscheint uns diese Deutung als falsch. Sie würde beinhalten, daß der Raum zwischen Faltenkranz und Sekretkanalwand ein Intrazellularraum wäre und daß damit der Sekretkanal intrazellulär liege. Dies ist aber offensichtlich nicht der Fall. Vielmehr liegt der Sekretkanal interzellulär und der Raum zwischen seiner Wandung und dem Faltenkranz ist ein Interzellularraum. Dies ist besonders deutlich bei der Nebendrüse, wo dieser Raum unkontrastiert ist und sich damit vom Cytoplasma der Zelle deutlich abhebt. Daß der Faltenkranz als Einfaltung der apikalen

Zellmembran *einer* Zelle — und nicht als Bildung von Zellmembranen zweier, aneinandergrenzender Zellen, die sich in Falten legen — zu verstehen ist, geht eindeutig daraus hervor, daß sich die Doppelmembranen des Faltenkranzes dicht vor der Kanalwand „aufspalten", die einzelnen Membranen nach rechts und links umbiegen und zurücklaufen (Abb. 3, vgl. Abb. 12k). Eine solche Bildung ist nur als Einfaltung einer einfachen Membran, eben der apikalen, an die Kanalwand angrenzenden Zellmembran zu deuten. Zu „Aufspaltungen der Doppelmembran" und damit zur Bildung großer, erweiterter Interzellularräume kommt es nun nicht nur im Bereich des Kanals, sondern auch in dem der Zelle zugekehrten Bereich des Faltenkranzes (Abb. 4, *IR*). Dies ist besonders deutlich bei der Nebendrüse und ihrem Ausführgang. In der Hauptdrüse und den übrigen Ausführgängen scheinen die Interzellularräume zu fehlen. Bei genauer Betrachtung kommt man jedoch zu dem Schluß, daß sie sehr wohl vorhanden, aber mit einer Masse gefüllt sind, deren Kontrastierung genau der der Kanalwandung entspricht: Gelegentlich treten auch hier im äußeren Bereich des Faltenkranzes erweiterte Räume auf, die eine solche stärkere Kontrastierung aufweisen (Abb. 10a, Pfeile) und offensichtlich den unkontrastierten Interzellularräumen bei der Nebendrüse (Abb. 4, *IR*) gleichzusetzen sind.

Die Entstehung des Faltenkranzes als Einfaltung der einfachen, apikalen, d. h. der Kanalwand zugekehrten Zellmembran der Kanalzellen läßt sich auch im distalen Bereich der Hauptdrüse erkennen, wo der Faltenkranz nur schwach ausgebildet ist (Abb. 8a u. c). Hier ziehen die Zellmembranen („Doppelmembranen") zwischen den Kanalzellen nicht unmittelbar bis zur Kanalwandung hin und teilen sich nicht erst hier auf; vielmehr geschieht die Aufspaltung jeweils zweier Zellmembranen offensichtlich schon in einigem Abstand von der Kanalwandung (Abb. 8a, Kreismarkierungen) — der Übergang von der „Doppelmembran", der lateralen Zellgrenze verschiedener Kanalzellen, zu den einfachen Membranen des Faltenkranzes ist hier sehr auffallend — und die beiden einzelnen „einfachen" Membranen legen sich nun in Falten; dabei können durch Zusammenlegen zweier Falten erneut „Doppelmembranen" entstehen, wie sie sich im typischen Fall im Faltenkranz zeigen. Auch bei gut ausgebildetem Faltenkranz führen die lateralen Zellmembranen nicht unmittelbar bis zur Kanalwand, vielmehr münden sie immer am äußeren Rand des Faltenkranzes (Abb. 6, 7a, 11, Kreismarkierung) in diesen ein.

Durch die Einfaltungen der Zellmembran zum Faltenkranz entstehen 3 verschiedene Interzellularräume: 1. der Raum um den Kanal („Kanalnaher Interzellularraum"), 2. die erweiterten Interzellularräume im äußeren Bereich des Faltenkranzes („Kanalferne Interzellularräume") und 3. die engen, nur selten erweiterten „Fugen-Räume" zwischen 2 Zellmembranen, die die beiden zuerstgenannten Interzellularräume miteinander verbinden (Abb. 12; *e*, *f*, *h*).

Durch die Einfaltungen wird die Zelle in ihrem apikalen Bereich aufgeteilt in lückenlos nebeneinanderliegende, feine *Zellfortsätze*. Diese sind im Gegensatz zu den fingerförmigen Mikrovilli in der *Längsrichtung* ausgedehnt, blätter- oder leistenartig, wie die Querschnitte, insbesondere bei den Serienschnitten (Abb. 9), beweisen. Man könnte den einzelnen Fortsatz als *Mikrosinus* und den ganzen Faltenkranz als „*Corona sinuosa*" bezeichnen. In Parallele zu setzen sind diese Mikrosinus etwa auch den „Compartments" der basalen Strukturen der Neben-

drüsenzellen (Wohlfarth-Bottermann u. Moericke 1960), die ja letztlich auch durch zahlreiche Zellmembraneinfaltungen entstehen.

Mit der eben gegebenen Deutung des Faltenkranzes ist noch nicht verständlich, daß oft 2 oder mehrere Einfaltungen im äußeren Bereich ineinander übergehen, also miteinander verschmolzen zu sein scheinen (Abb. 6i und 12i). Wir möchten annehmen, daß dies dadurch zustande kommt, daß die Einfaltungen sich in verschiedenen Richtungen des Raumes gabeln können (vgl. Abb. 12, *l*), räumlich betrachtet sich also eine etwa glockenförmige Einfaltung bildet. Es entstehen dadurch neben den Mikrosinus im eben beschriebenen Sinne „transversal vorstoßende Zellfortsätze" (Abb. 12b), im ganzen ein vielfältiges, längs des Kanals verlaufendes und radialangeordnetes System von feinen Zellfortsätzen. Diese Fortsätze stehen, wie man annehmen muß, durchweg mit dem Cytoplasma der Zelle — wenn auch nur an schmalen Stellen — in Verbindung. Ein ähnliches System von Zellfortsätzen konnte auch Hager (1959) in der sog. Grundsubstanz der Groß- und Kleinhirnrinde der Säuger nachweisen. Hier werden die sehr kleinen Zellfortsätze, die eine starke Verzahnung der Oberfläche verschiedener (oder identischer) Zellen und damit ein ausgedehntes interzelluläres Fugensystem erzeugen, als morphologischer Ausdruck eines intensiven Stoffaustausches und eines Stofftransportes gedeutet.

Transversale Zellfortsätze kommen offenbar auch im Bereich der lateralen Zellgrenzen vor. Die „membranumhüllten Gebilde" (Abb. 7, Pfeile und Kreuze) möchten wir als solche deuten. Man kann sie sich demnach folgendermaßen entstanden denken: in den sich erweiternden Interzellularraum zwischen 2 Zellmembranen drängt sich von einer Zelle her transversal, also schräg von unten oder oben, ein fingerförmiger Fortsatz hinein. Die diesen Fortsatz einhüllende Membran gehört demnach zur Zellmembran einer der beiden aneinandergrenzenden Kanalzellen. Man könnte sich auch vorstellen, daß sich nicht ein Fortsatz ausdehnt, sondern daß sich die Zellmembran glockenförmig in schräger Richtung in das Cytoplasma hinein einfaltet.

Die Einfaltungen der Zellmembran im Faltenkranz bewirken, daß der apikale Teil der Kanalzellen mit einer außerordentlich großen Oberfläche dem Sekretkanal anliegt, obgleich dessen Oberfläche im Vergleich zu der durch die Falten erzeugten apikalen Fläche der Kanalzellen verschwindend gering ist (Abb. 12). Dies ist zweifelsohne ein außerordentlich wirksames Prinzip einer Vergrößerung der Zelloberfläche, wenn der zur Verfügung stehende interzelluläre Raum, gegen den sie sich ausbilden und auswirken soll, *klein* ist. Man darf wohl mit Sicherheit annehmen, daß diese interessante Differenzierungsform der Zellmembran, die Ausbildung eines großflächigen interzellulären Fugensystems, eine funktionelle Bedeutung besitzt.

Die *Wanderung des Sekrets* aus den Drüsenzellen in den Sekretkanal ist bei der *Nebendrüse* am leichtesten zu verstehen. Hier erweitert sich der Sekretkanal an seinem distalen Ende in der Drüse (Abb. 6) und ist offen. Diese Öffnung steht mit dem „Lumen der Schlauchkomplexe", d. h. den intrazellulären Sekretkanälchen, in Verbindung. Das Sekret kann also unmittelbar aus den Sekretkanälchen, insbesondere aus deren blasigen Erweiterungen, in denen es sich sammelt, in den Sekretkanal gelangen. [Eine Erweiterung des zentralen Bereichs der Schlauchkomplexe, wie sie früher (Wohlfarth-Bottermann u. Moericke

1960, Abb. 6b) dargestellt wurden, scheint dabei nicht notwendig und typisch zu sein.] Da sowohl das Lumen der intrazellulären Sekretkanälchen als auch das Lumen des Sekretkanals selbst als Interzellularraum zu verstehen sind, so ist eine Verbindung von beiden — ohne Zwischenschaltung von Kanalzellen — durchaus verständlich. Abb. 6 zeigt geradezu, wie der Sekretkanal exzentrisch in den Kanalzellen liegt und wie er an die Drüsenzellen heranreicht: von 3 Seiten (im Bild oben und rechts) treten die Drüsenzellen ganz dicht heran, nur nach einer Richtung hin (im Bild links unten) schließt sich ein größerer Bereich einer Kanalzelle an. Ob die Verbindung zwischen Sekretkanälchen und Sekretkanal dauernd besteht oder nur jeweils im Zusammenhang mit der Ableitung gebildet wird, ist noch nicht geklärt.

Das in der Drüsenzelle gebildete, wasserreiche Prosekret der Nebendrüse könnte also zunächst durch die Membranen der Sekretkanälchen in deren Lumen eindringen. Zu diesem Vorgang ist Energie notwendig, die von den den „Schlauchkomplex" umgebenden Mitochondrien geliefert werden kann. Die randständigen Erweiterungen der Sekretkanälchen würden mithin u. a. einer Sekretspeicherung dienen. Sie könnten eine kurzfristige Abgabe größerer Sekretmengen ermöglichen.

Ungeklärt ist noch, welche Bedeutung der Faltenkranz im Verlauf des ganzen Kanals besitzt, und zwar die für die Nebendrüse spezifische Form mit dem kanalnahen Interzellularraum und den kanalfernen erweiterten Interzellularräumen. Sicher dürfte sein, daß ein doppelter Stoffdurchtritt erfolgt, und zwar ein solcher durch die Membranen des Faltenkranzes und ein solcher durch die Sekretkanalwandung hindurch. Unbestimmt ist jedoch, ob es sich um eine Einwanderung von Stoffen aus der Kanalzelle in den Interzellularraum und von hier in den Sekretkanal handelt (Sekretion oder Exkretion) oder ob umgekehrt eine Rückresorption aus dem Sekretkanal über den Interzellularraum in die Kanalzelle hinein erfolgt. In jedem Fall dürften die zahlreichen Mitochondrien im Bereich des Faltenkranzes die Energie für solche Vorgänge liefern.

Die Frage nach der Bedeutung des Faltenkranzes ergibt sich ebenso bei den *Ausführgängen* der Hauptdrüse und dem gemeinsamen *Ausführgang*. Auch in den Ausführgängen kann es sich um eine Stoffabgabe in den Kanal hinein oder um eine Rückresorption handeln. Es läßt sich zur Zeit nicht mit Sicherheit entscheiden, welcher der beiden Vorgänge hier abläuft. Die im Vergleich zur Nebendrüse anders geartete Ausbildung des Faltenkranzes (das scheinbare Fehlen eines kanalnahen Interzellularraumes und das häufige Fehlen von größeren, kanalfernen Interzellularräumen) kann darauf hindeuten, daß sich in den Ausführgängen der Hauptdrüse und dem gemeinsamen Ausführgang einerseits und in der Nebendrüse andererseits etwas Verschiedenes abspielt.

Auffallend erscheint übrigens eine Beziehung zwischen dem Auftreten kanalferner und mit kontrastreichem Inhalt gefüllten Interzellularen und der Füllung des Sekretkanals zu sein: Solche Interzellularen treten nur dann in Erscheinung, wenn der Sekretkanal selbst *eine unkontrastierbare* Flüssigkeit enthällt (vgl. Abb. 10a im Gegensatz zu 10c).

Mit Sicherheit kann man behaupten, daß die Ausführgänge nicht nur eine morphologische, sondern eine wichtige physiologische Funktion haben, wie dies an Hand von lichtmikroskopischen Untersuchungen an anderen Speicheldrüsen schon früher mehrfach vermutet wurde (vgl. Bargmann 1956): die Faltenkranz-

struktur und die zahlreichen Mitochondrien können kaum anders gedeutet werden. Das fertige Sekret entsteht also erst im Verlauf der Durchwanderung des Sekretkanals. Die von uns gewählte Bezeichnung „Prosekret" findet hier ihre Begründung.

Im Gegensatz zur Nebendrüse sind die Vorgänge der Prosekreteinwanderung in den Kanal im Bereich von *Haupt-* und *Deckzellen* der Hauptdrüse offenbar noch komplizierter. Man kann auf Grund der Strukturen an 4 Mechanismen denken, die möglicherweise nebeneinander vorkommen.

1. Das in den Drüsenzellen gebildete Prosekret wandert zunächst in die *Kanalzellen* ein, und zwar in der Weise, daß große, blasige Einstülpungen der Zellmembranen beider Zellen in die Kanalzelle hineingeschoben werden, diese sich abschnüren, so daß nach Auflösen der Membranen das Prosekret sich in der Kanalzelle befindet. Für diesen Mechanismus sprechen ebenso die regelmäßig zu beobachtenden Einstülpungen wie die vielfach sich findenden verbindungslosen Membranteile in den Kanalzellen [vgl. Abb. 7 (Doppelpfeil) und Moericke u. Wohlfarth-Bottermann 1960, Abb. 12]. In Abb. 7 dieser Arbeit wird an Hand von Serienschnitten gezeigt, daß es sich um großflächige Membranen handelt und nicht etwa um schlauchförmige Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums. Aus den Kanalzellen müßte das Sekret dann unter Beteiligung des Faltenkranzes durch diesen hindurch in den Sekretkanal gelangen.

2. Das Prosekret sammelt sich in *Interzellularen* zwischen Drüsenzellen bzw. Kanalzellen (Abb. 11). Auch in den Drüsenzellen selbst entstehen ja bei der Auflösung der Prosekretgranula Speicheltröpfchen, d. h. membranumhüllte Blasen, die möglicherweise in solche Interzellularen einmünden, etwa wie das bei der Sekretabgabe der Zellen der Milchdrüse beschrieben ist (Bargmann u. Knoop 1959). Aus diesen Interzellularen könnte das Prosekret durch die interzellularen Fugenräume des Faltenkranzes hindurch unmittelbar in den kanalnahen Interzellularraum eindringen und durch die Wandung des Kanals in diesen selbst hineingelangen. Dies scheint insbesondere im Deckzellenbereich vorzukommen. Möglicherweise könnte auch Prosekret aus den Hauptzellen innerhalb von Vakuolen (Moericke u. Wohlfarth-Bottermann 1960, Abb. 3) in den Bereich der Deckzellen-Interzellularen vordringen.

3. *Verzweigungen des Sekretkanals* in jede einzelne Drüsenzelle hinein, wie sie Weber (1928) in seinem Schema zeichnet (und das wir als Abb. 1 zunächst übernommen haben), existieren in weiten Bereichen der Hauptdrüse offenbar nicht. Im Bereich der Deckzellen kommen zwar Verzweigungen vor, wenigstens möchten wir manche Strukturen — englumige Kanäle mit schwach ausgebildetem Faltenkranz (Abb. 8b) — als solche deuten, jedoch erscheint uns fraglich, ob diese Verzweigungen wirklich in jede einzelne Drüsenzelle hineinragen. Die bisherigen Abbildungen zeigen Verzweigungen immer nur im Bereich der Kanalzellen selbst. Immerhin mögen solche Verästelungen die Aufnahme von Prosekret aus einzelnen Drüsenzellen erleichtern.

4. Schließlich ist an die lichtmikroskopisch zu beobachtende „*Pumpbewegung*" im distalen Bereich der Hauptdrüse zu erinnern (Moericke u. Wohlfarth-Bottermann 1960, S. 161). Elektronenmikroskopisch ließen sich neuerdings in diesem Bereich Myofibrillen feststellen. In einem Fall war der Sekretkanal im Bereich dieser Myofibrillen (also an seinem distalen Ende in der Hauptdrüse)

offen. Die Verhältnisse müssen noch näher untersucht werden, könnten aber darauf hindeuten, daß das Prosekret der distalen Hauptzellen unter Mitwirkung von Pumpmechanismen aus den Kanalzellen in den offenen Sekretkanal unmittelbar eingepumpt wird.

Zur Frage eines Transports des Prosekrets im Interzellularraum zwischen Drüsenzellen und Kanalzellen einerseits und Kanalzellen und Kanalzellen andererseits interessiert die Tatsache, daß die lateralen Grenzen der Kanalzellen untereinander aus — nur selten großlumig erweiterten — Interzellularfugen bestehen, die durch „septierte Desmosomen" (Wood 1959) abgedichtet erscheinen (vgl. Abb. 12, *g*). In den Abb. 7 und 8 sind im Interzellularraum zwischen 2 Kanalzellen feine Querstrukturen zu erkennen, die den „septate desmosomes" entsprechen, die Wood (1959) zwischen Epithelzellen von Hydra beschrieb. Dieser Autor vermutet, daß durch solche Desmosomen eine festere Zellbindung und eine Verminderung des Stofftransports in den Interzellularfugen erreicht wird.

Letzteres ist jedoch nicht einzusehen, wenn es sich um parallelverlaufende Septen handelt, die zwar einen Stofftransport quer zu ihrer Laufrichtung verhindern können, einen Transport *in* ihrer Verlaufsrichtung jedoch nicht. Man könnte sogar daran denken, daß durch solche „septierte" Desmosomen eine gerichtete Stoffwanderung im Interzellularfugensystem bewirkt wird.

Von den vorstehend unter 1—4 angegebenen Möglichkeiten erscheint uns der *interzelluläre Transportweg* (2) mit hoher Wahrscheinlichkeit eine wichtige Rolle zu spielen. Folgende Gründe veranlassen uns zu dieser Annahme:

1. Die Bedeutung der Interzellularräume kommt durch die Existenz von „Intrazellulären Sekretkanälchen" (in den Zellen der Nebendrüse, Wohlfarth-Bottermann u. Moericke 1960) zum Ausdruck, die Einstülpungen der Zellmembran ins Zellinnere darstellen, deren Lumen also offene Verbindung zu den Interzellularräumen der Kanalzellen besitzen muß.

2. In den Fällen, wo die Falten des Faltenkranzes unmittelbar an der Wand des Sekretkanals anzusetzen scheinen, sind sämtliche Interzellularräume (Abb. 10c), auch ihre kanalfernen Erweiterungen (Abb. 10a), sofern solche vorhanden sind, offensichtlich mit stark kontrastiertem Prosekret gefüllt.

3. Eine Öffnung des Sekretkanals an seinem Ende in der Drüse spricht nicht gegen einen interzellulären Transport, da der Sekretkanal in seiner ganzen Länge, also immer im Interzellularraum liegt. Ein Eindringen des Prosekrets am offenen Ende des Sekretkanals würde nur ein Passieren der Kanalwand ersparen.

4. Der Faltenkranz ist nicht nur bei Kanalzellen ausgebildet, die unmittelbar an eine Drüsenzelle grenzen, sondern kommt auch bei den Kanalzellen des gemeinsamen Ausführganges vor, an Orten also, wo eine Funktion des Faltenkranzes im Hinblick auf eine Abscheidung von Prosekret unwahrscheinlich ist. Vielmehr ist zu vermuten, daß Stoffe aus den interzellulären Fugenräumen im Bereich des Faltenkranzes rückresorbiert werden, was gleichzeitig eine Weiterverarbeitung des Prosekrets bedeutete.

Die Verteilung von stark- und schwachkontrastiertem Inhalt im Sekretkanal gibt einen Hinweis auf die Unterschiede des Prosekrets in Hauptzellen, Deckzellen und Nebendrüsenzellen sowie auf eine solche Weiterverarbeitung des Prosekrets im Verlauf der Ausführgänge: In der Nebendrüse und ihrem Ausführgang lag immer die schwachkontrastierte Form des Prosekrets vor, das gleiche gilt

für den distalen Teil der Hauptdrüse. Im proximalen Teil (Deckzellenbereich) dagegen war das Prosekret zumeist sehr stark kontrastiert. Im Ausführgang der Hauptdrüse und im gemeinsamen Ausführgang können beide Phänomene vorkommen. Diese Verteilung läßt sich so deuten: In der Nebendrüse wird wasserreiches, schwachkontrastiertes Sekret gebildet. Das Prosekret der Hauptzellen ist ebenfalls kontrastarm, wird aber durch eine Rückresorption im Faltenkranz im Bereich der Deckzellen kontrastreich. Daß ein Prosekret der Hauptzellen durch Zumischung von Deckzellprosekret kontrastreich werden kann, erscheint uns unwahrscheinlich. Die außerordentlich starke Ausbildung des Faltenkranzes im Deckzellenbereich läßt allerdings beide Deutungsweisen zu. Im Ausführgang der Hauptdrüse und im gemeinsamen Ausführgang kann jedoch sowohl das von der Nebendrüse kommende kontrastarme wie auch das von der Hauptdrüse kommende kontrastreiche Sekret vorhanden sein. Wie es den Tieren — offenbar willkürlich — möglich ist, entweder das festwerdende oder das flüssigbleibende Sekret abzugeben (was experimentell beobachtet werden kann) und wie das „richtige" Mischungsverhältnis von Haupt- und Deckzellensekret erzeugt wird, bleibt ungewiß.

Gewisse Ähnlichkeiten zwischen den von uns untersuchten Speicheldrüsen und denen von Säugetieren könnte man mit allen Vorbehalten dann sehen, wenn der sog. Gleitspeichel aus mukösen Drüsen der Säuger mit dem Prosekret der Hauptzellen verglichen werden dürfte. Der Verdünnungsspeichel aus serösen Drüsen könnte dann dem Produkt der Deckzellen bzw. der Nebendrüsenzellen entsprechen. Eine Ausscheidungsfunktion der Speicheldrüsen, wie sie bei Säugern bewiesen ist (Harnstoff, Harnsäure u. a.), ist bei Blattläusen durchaus möglich, da ihnen Malpighische Gefäße fehlen. Auch die bei Säugern vorkommenden „interzellulären Sekretkapillaren", die sich zum Teil bis in die Nähe der Basalmembran erstrecken sollen, sind bei Blattläusen in Form der von uns beschriebenen intrazellulären Sekretkanälchen („Schlauchkomplexe", Wohlfarth-Bottermann u. Moericke 1960) vorhanden. Schließlich werden auch bei Säugetieren resorptive Prozesse im Sekretrohr vermutet (vgl. Bargmann 1956). Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen der Speicheldrüsen von Säugetieren werden also vielleicht interessante Parallelen aufdecken können.

Im ganzen muß man wohl feststellen, daß trotz der sehr auffallenden Strukturen in den Kanalzellen die Frage der Sekretableitung bei unserem Objekt auch jetzt noch nicht endgültig zu klären ist. Die Verhältnisse mögen bei den Blattläusen insofern besondere sein, als man hier einerseits kein Speichelreservoir — wie etwa bei Fliegenlarven — vorfindet und als andererseits der Sekretkanal besonders starkwandig sein muß, damit er unter dem Sog der Speichelpumpe nicht kollabiert. Trotzdem kann man wohl vermuten, daß die bei vielen Insektendrüsen beobachtete „*Streifung*" („Hof", „Binnenbläschen") im Bereich der ausführenden Teile (Weber 1954, Pesson 1944) durchweg eine ähnliche *Faltenkranzstruktur* besitzt, d. h. aus einem *großflächigen System von Interzellularfugen* und zahlreichen Mikrosinus besteht. Eine vergleichende Untersuchung dürfte auch den ableitenden Mechanismus besser erfassen lassen.

Die Öffnung am Ende des Sekretkanals, wie sie eindeutig in der Nebendrüse und vermutlich auch in der Hauptdrüse vorkommt, kann zweifellos die Einwanderung von *Viren* aus den Zellen in den Sekretkanal erleichtern.

Zusammenfassung

1. Das sekretableitende System in den Speicheldrüsen von *Myzus persicae* (Sulz.) besteht aus einem derbwandigen, *interzellulär liegenden Sekretkanal*, der von besonderen Kanalzellen umgeben ist. Das Cytoplasma dieser Zellen ist locker strukturiert, ein zusammenhängendes endoplasmatisches Retikulum ist nicht ausgebildet, die lateralen Zellgrenzen sind vielfältig verzahnt.

2. Die *Zellmembran* des apikalen Bereiches jeder Kanalzelle ist zum Sekretkanal hin in ausgedehnten *Falten* angeordnet. Hierdurch entsteht rings um das Kanalrohr — in den Drüsenlappen selbst ebenso wie in den Ausführgängen — ein *Faltenkranz („Corona sinuosa")*, der dem lichtmikroskopisch beschriebenen „Hof" bzw. der „Streifenzone" oder dem „Binnenbläschen" des Sekretkanals in anderen Insektendrüsen entsprechen dürfte. Der Faltenkranz ist im Bereich der Hauptzellen der Hauptdrüse nur schwach, im Bereich der Deckzellen besonders stark ausgebildet.

3. Durch die Einfaltungen der Zellmembran entstehen längsverlaufende, *feine blatt- oder leistenartige Fortsätze der Zelle*. Für diese charakteristischen morphologischen Einheiten des Faltenkranzes wird in Gegenüberstellung zu den Mikrovilli der Ausdruck *Mikrosinus* vorgeschlagen.

4. Zwischen den Mikrosinus sind enge *interzelluläre Fugenräume*, die sich insbesondere in der Nebendrüse und ihrem Ausführgang zu größeren Interzellularräumen erweitern können. Diese Räume erscheinen bei der Nebendrüse mit unkontrastiertem Inhalt, im Bereich der Deckzellen und den Ausführgängen dagegen mit stark kontrastiertem Inhalt gefüllt.

5. Der *Inhalt des Sekretkanals* ist im Bereich der Nebendrüse und ihrem Ausführgang unkontrastiert (vermutlich die wässerige Form des Speichels), im distalen Bereich der Hauptdrüse ist er ebenfalls unkontrastiert, im proximalen Bereich (Deckzellen) dagegen stark kontrastiert. In den Ausführgängen selbst wechselt das Bild.

6. Der *Sekretkanal* ist an seinem distalen Ende in der Nebendrüse und vermutlich auch in der Hauptdrüse *offen*. In der Nebendrüse steht diese Öffnung in Verbindung mit den *intrazellulären Sekretkanälchen* („Schlauchkomplexen") der Drüsenzellen, in der Hauptdrüse mittelbar mit Myofibrillen (Pumpmechanismus). Verzweigungen des Sekretkanals wurden nur im Bereich der Deckzellen beobachtet.

7. Große *Interzellularräume* kommen auch zwischen den Zellmembranen von Kanal- und Drüsenzellen vor.

8. Das Prosekret gelangt in der Nebendrüse sicherlich aus den intrazellulären Sekretkanälchen durch das *offene Ende des Sekretkanals* in diesen hinein. Das Entsprechende trifft vermutlich für das distale Ende des Sekretkanals in der Hauptdrüse zu. Im übrigen Teil der Hauptdrüse scheinen die *Interzellularräume* eine besondere Rolle zu spielen. Dabei dringt das Prosekret vermutlich unmittelbar aus den Drüsenzellen in den Interzellularraum ein (vgl. Punkt 7). Eine andere Möglichkeit, daß das Prosekret durch blasige Ausstülpungen zunächst in die Kanalzellen und von hier aus erst in die interzellulären Fugenräume des Faltenkranzes gelangt, wird diskutiert.

9. Der *Faltenkranz* hat offenbar insbesondere im Bereich der Ausführgänge eine Funktion bei der *Weiterverarbeitung des Prosekrets*, wobei das Prinzip der

Vergrößerung der Zelloberfläche gegenüber einem kleinen Raum (Kanalwand) in besonders interessanter Form verwirklicht ist. Die zahlreichen kleinen Mitochondrien in der Peripherie des Faltenkranzes werden die Energie für Stofftransporte liefern.

10. Die Membraneinfaltungen der apikalen Zelloberfläche der Kanalzellen, ihre faltenkranzähnliche Anordnung um den Sekretkanal sowie transversal verlaufende Zellfortsätze werden in einer schematischen Zeichnung verdeutlicht, in der versucht wird, die gesamte *räumliche Anordnung des Strukturkomplexes* darzustellen.

Literatur

Baptist, B. A.: The morphology and physiology of the salivary gland of *Hemiptera-Heteroptera*. Quart. J. micr. Sci. **83**, 91—139 (1941).

Bargmann, W.: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Bargmann, W., u. A. Knoop: Über die Morphologie der Milchsekretion. Licht- und elektronenmikroskopische Studien an der Milchdrüse der Ratte. Z. Zellforsch. **49**, 344—388 (1959).

Fawcett, D. W.: Structural specialisations of the cell surface. In S. L. Palay, Frontiers in Cytology. New Haven: Yale University Press 1958.

Gresson, R. A. R., and L. T. Threadgold: A light and electron microscope study of the epithelial cells of the gut of *Fasciola hepatica* L. J. biophys. biochem. Cytol. **6**, 157—162 (1959).

Hager, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur der sogenannten Grundsubstanz in der Groß- und Kleinhirnrinde des Säugetieres. Arch. Psychiat. Nervenkr. **198**, 574—600 (1959).

Hirsch, G. C.: Dynamik der tierischen Zelle. In Handbuch der Biologie, Bd. 1, H. 11/12, Lief. 97/98. Konstanz: Akademische Verlagsgesellschaft 1960.

Miles, P. W.: Secretion of two types of saliva by an Aphid. Nature (Lond.) **183**, 756 (1959).

Moericke, V., u. K. E. Wohlfarth-Bottermann: Zur funktionellen Morphologie der Speicheldrüsen von Homopteren. I. Mitt. Die Hauptzellen der Hauptdrüse von *Myzus persicae* (Sulz.), *Aphididae*. Z. Zellforsch. **51**, 157—184 (1960).

Pesson, P.: Contribution à l'étude morphologique et fonctionelle de la tête, de l'appareil buccal et du tube digestif des femelles de Coccides. Thèses Facult. Sci., Univ. Paris, Nr d'ordre 2899, Sér. A, Nr de sér. 2032. Imprimerie nationale Paris 1944.

Policard, A., et C. A. Baud: Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissues. Paris: Masson & Cie. 1958.

Rauch, S.: Die Speicheldrüsen des Menschen, S. 17—32. Stuttgart: Georg Thieme 1959.

Weber, H.: Skelett, Muskulatur und Darm der schwarzen Blattlaus *Aphis fabae* (Scop.). Zoologica (Stuttgart) **28**, H. 76 (1928).

Weber, H.: Grundriß der Insektenkunde. Stuttgart: Gustav Fischer 1954.

Wohlfarth-Bottermann, K. E., u. V. Moericke: Gesetzmäßiges Vorkommen cytoplasmatischer Lamellensysteme in Abhängigkeit vom Funktionsrhythmus einer Zelle. Z. Naturforsch. **14b**, 446—450 (1959).

Wohlfarth-Bottermann, K. E., u. V. Moericke: Zur funktionellen Morphologie der Speicheldrüsen von Homopteren. III. Mitt. Die Nebendrüse von *Myzus persicae* (Sulz.), *Aphididae*. Z. Zellforsch. **52**, 346—361 (1960).

Wood, R. L.: Intercellular attachment in the epithelium of *Hydra* as revealed by electron microscopy. J. biophys. biochem. Cytol. **6**, 343—364 (1959).

Dozent Dr. V. Moericke,
Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn, Nußallee

Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann,
Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn,
Poppelsdorfer Schloß

Zeitschrift für Zellforschung 53, 50—54 (1960)

Aus dem Pathologischen Institut der Humboldt-Universität Berlin, dem Rudolf Virchow-Haus der Charité (Direktor: Prof. Dr. L. H. Kettler)

ÜBER EINEN NUCLEOLUS MIT MEMBRAN

Von

Heinz David

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Juli 1960)

Lichtmikroskopische Untersuchungen schienen das Bestehen einer den Nucleolus umgebenden Membran gesichert zu haben (vgl. hierzu Stockinger 1953, Vincent 1955, Stich 1956, Hertl 1957), d.h. das fädige oder granuläre Innere des Nucleolus stellte sich im allgemeinen als durch eine Membran vom übrigen Karyoplasma abgegrenzt dar, die häufig eine positive Feulgen-Reaktion gab. Diese Befunde konnten aber bisher elektronenmikroskopisch nicht bestätigt werden. Der Nucleolus wird vielmehr als ein intranucleäres Gebilde beschrieben, das sich aus den fädigen Nucleolonemata und der Pars amorpha zusammensetzt (Estable, Sotelo 1951) und keine sichtbare Abgrenzung zum Karyoplasma besitzt, d.h. *keine Membran aufweist* (Bernhard, Haguenau und Oberling 1952, Horstmann und Knoop 1957, Horstmann 1958, Policard und Baud 1958, Yasuzumi, Sawada, Sugihara, Kiriyama und Sugioka 1958, Miller 1959).

Da unseres Wissens Übereinstimmungen mit den lichtmikroskopisch sichtbaren Membrandarstellungen noch in keinem Falle erhalten werden konnten, wollen wir den seltenen Befund eines membranhaltigen Nucleolus in der Leberepithelzelle kurz beschreiben.

Methodik

Im Rahmen ausgedehnter Untersuchungen zur Frage der submikroskopischen Morphologie der Leberzelle unter verschiedenen Ernährungszuständen wurden die Veränderungen bei Wiederfütterung nach absolutem Hunger erforscht. Für die spezielle Frage nach Veränderungen der Nucleolusstruktur wurden die Lebern von Mäusen, Ratten, Meerschweinchen, Goldhamstern, Kaninchen und Tauben 24 und 48 Std nach 5- und 8tägigem Hunger untersucht. Dazu wurden 1—2 mm große Leberstückchen für 1—2 Std in isotonischer, gepufferter OsO_4-Lösung fixiert und in Aceton entwässert. Einbettung in Vestopal W (nach Ryter und Kellenberger 1958). Herstellung der Dünnschnitte mit einem Ultramikrotom nach Niklowitz. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bei 7200, 12800 und 23200facher Vergrößerung im elektrostatischen Mikroskop Ty D_2 der Firma VEB Carl Zeiss-Jena, Strahlspannung von 48—50 KV. Lichtoptische Nachvergrößerungen.

Ergebnisse

Die Untersuchungen an den Leberepithelzellen sowohl von Hungertieren als auch wiedergefütterten Tieren bestätigen bezüglich des Nucleolus im allgemeinen die bisherigen Befunde. Sehr häufig ist bei den gefütterten Tieren eine Vermehrung der osmiophilen (RNS-) Granula vom Nucleolus in Richtung zur Kernmembran zu beobachten. Während die größte Zahl der Nucleoli außer einem selten anzutreffenden osmiophoben Hof keine Abgrenzung zur Umgebung aufweist, haben wir in einem Fall (Maus) einen von einer echten Grenzmembran umhüllten Nucleolus gesehen (Abb. 1).

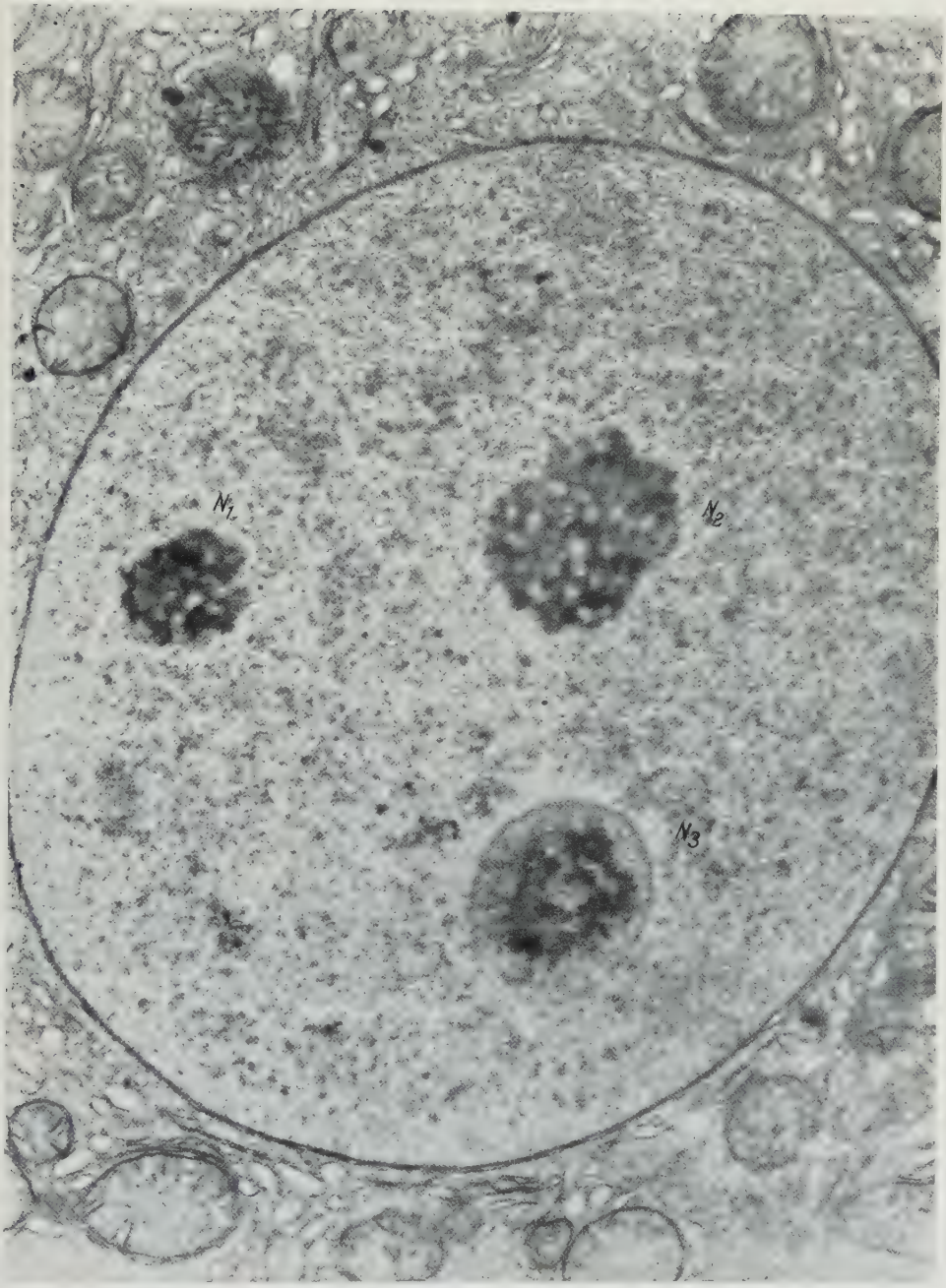


Abb. 1. Ausschnitt aus einer Leberzelle einer Maus nach 5tägigem absoluten Hunger und 2tägiger Wiederfütterung. Innerhalb des Kerns 3 Nucleoli. N_1 und N_2 von typischem Aufbau, N_3 von einer Membran umgeben. Ges.-Vergr. 14400 : 1

Es handelt sich um ein in der Mitte $1{,}6 \times 1{,}9\,\mu$ großes Kernkörperchen einer Leberepithelzelle, dessen Umfang also durchaus innerhalb der normalen Schwan-

kungen der Nucleolusgröße liegt. Der zentrale Anteil wird durch die Nucleolonemata mit dazwischengelagerten, ungeordneten osmiophilen Granula (Pars amorpha) ausgefüllt. (Abb. 2). Die Konzentration der RNS-Granula in der Randzone des Nucleolus ist deutlich höher als in dem umgebenden Karyoplasma, auch ist die Anordnung regelmäßiger. Der gesamte Komplex wird an dieser Stelle von einer in vielen Teilen doppelt konturierten Membran umgeben, deren Osmio-

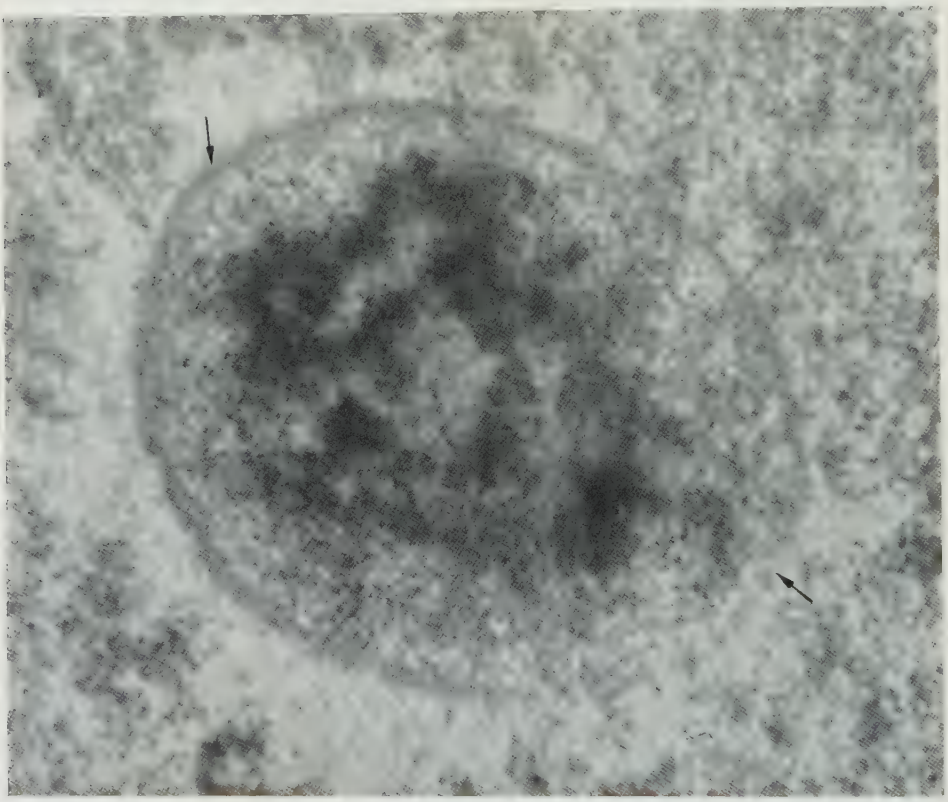


Abb. 2. Ausschnitt aus Abb. 1 mit dem membranhaltigen Nucleolus (N_3). Zusammensetzung aus Nucleolonemata und Pars amorpha. An verschiedenen Stellen (↗) angedeutete Doppelkonturen der Membran. Ges.-Vergr. 46400:1

philie geringer ist als die der Kernmembran. Die Gesamtdicke der Membran schwankt zwischen 350 und 550 Å. Das Karyoplasma in der Umgebung weist eine erhebliche Verminderung der osmiophilen Granula auf, so daß ein heller Hof entsteht. Ein Stufenschnitt durch einen Pol des Nucleolus zeigt ebenfalls einen zentral stark osmiophilen Bezirk, an den sich ein weniger osmiophiler Randbereich anschließt (Abb. 3). Die Membran ist hier mehr als doppelt so dick wie im mittleren Teil. Sie zeigt an einigen Stellen eine Ausbildung von 4 Einzellamellen. Auch in diesem Teilgebiet ist das umgebende Karyoplasma stark osmiophob.

Diskussion

Differentialdiagnostisch muß der Befund eines membranhaltigen Nucleolus im elektronenmikroskopischen Bild besonders in Hinblick auf die intranucleären Einschlußkörper verschiedener Genese diskutiert werden (WESSEL 1958 u.a.),

Abb. 3. Stufenschnitt aus dem gleichen Leberzellkern wie in Abb. 1 mit Anschnitt eines Poles des membranhaltigen Nucleolus (N_3). Stark osmiophiles Zentrum des Kernkörperchens mit weniger osmiophilem Randgebiet. Mehrfach konturierte Membran, bei ↗ Darstellung von 4 Einzelmembranen. In der Umgebung osmiophober Hof. Im oberen Bildteil Nucleolus (N_4) von typischem submikroskopischen Aufbau. Ges.-Vergr. 38400:1

die als Anschnitte oder Abschnürungen von Cytoplasmateilen innerhalb des Kerns anzusehen sind und für das Cytoplasma charakteristische Elemente enthalten (David 1961 u.a.). Da es sich bei unserer Beobachtung um die typische Zusammensetzung eines Nucleolus handelt, glauben wir, eine solche Genese ausschließen

zu können. Es besteht weiter die Möglichkeit, daß ein intranucleärer Einschlußkörper auf Grund der häufigen Durchseuchung der Tierstämme durch nichtpathogene Viren vorliegt. Jedoch lassen sich für diese Entstehungsart keine eindeutigen Beweise erbringen. Weiterhin kann ein Artefakt, etwa als Ausdruck der Einbettung in Polyester, unseres Erachtens ausgeschlossen werden.

Die Bildung der Nucleolusmembran scheint durch Kondensation der umgebenden RNS- und DNS-Granula des Karyoplasmas erfolgt zu sein, so daß es zur Ausbildung des osmiophoben Hofes an der im allgemeinen unstrukturierten Nucleolus-Karyoplasma-Grenzfläche kommt. Die Membranbildung steht nach unserer Meinung in engem Zusammenhang mit der häufig (Stowell 1948, Caspersson 1950), aber nicht immer (David 1958, 1961) bedeutungsvollen Rolle des Nucleolus bei der RNS- und Eiweißsynthese in der Regenerationsphase nach absolutem Hunger.

Zusammenfassung

Es wird der seltene Befund eines Nucleolus mit elektronenmikroskopisch erkennbarer Membran in einer Leberepithelzelle der Maus beschrieben, der im übrigen den typischen Aufbau des Nucleolus erkennen läßt.

Literatur

Bernhard, W., F. Haguenau et C. Oberling: L'ultrastructure du nucléole de quelques cellules animales, révélée par le microscope electronique. Experientia (Basel) **8**, 58—59 (1952).

Caspersson, T. O.: Cell growth and cell function. New York: W. W. Norton Comp. 1950.

David, H.: Korrelationen zwischen Größe und Zahl der Nukleolen und cytoplasmatischer RNS in den Lebern verschiedener Tiere während und nach absolutem Hunger. Verh. Dtsch. Ges. Path. 42. Tagg 1958, S. 417—421. 1959.

— Ribonukleinsäurestoffwechsel und Nukleolusgröße in den Lebern von Hungertieren. Z. ges. inn. Med. **14**, 63—77 (1959).

— Die Leber bei Nahrungsmangel und Mangelernährung. Berlin: Akademie Verlag 1961. Im Druck.

Estable, C., y J. R. Sotelo: Una nueva estructura celular: el Nucleolonema. Publ. Inst. Invest. Ci. Biol. **1**, 105—126 (1951).

Hertl, M.: Zum Nucleolus-Problem. Z. Zellforsch. **46**, 18—51 (1957).

Horstmann, E.: Zur Elektronenmikroskopie des Nukleolus und des Karyoplasmas. Verh. Dtsch. Ges. Path. 41. Tagg, S. 361—365, 1957.

—, A. Knoop: Zur Struktur des Nucleolus und des Kerns. Z. Zellforsch. **46**, 100—107 (1957).

Miller, F.: Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenmikroskopischen Bild. Verh. Dtsch. Ges. Path. 42. Tagg 1958, S. 261—332. 1959.

Policard, A., et C. A. Baud: Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus. Paris: Masson & Cie. 1958.

Ryter, A., et E. Kellenberger: L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie. J. ultrastruct. Res. **2**, 200—214 (1958).

Stich, H.: Bau und Funktion der Nukleolen. Experientia (Basel) **6b**, 7—14 (1956).

Stockinger, L.: Das Kernkörperchen. Protoplasma (Berl.) **42**, 365—413 (1953).

Stowell, R. E.: Nucleic acids and cytological changes in regenerating rat liver. Arch. Path. (Chicago) **46**, 164—178 (1948).

Vincent, W. S.: Structure and chemistry of nucleoli. Int. Rev. Cytol. **4**, 269—298 (1955).

Wessel, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Einschlüssen in Leberzellkernen der Maus nach Colchizinbehandlung. Verh. Dtsch. Ges. Path. 41. Tagg. 1957, S. 299—302. 1958.

Yasuzumi, G., T. Sawada, R. Sugihara, M. Kiriyama and M. Sugioka: Electron microscope researches on the ultrastructure of nucleoli in animal tissues. Z. Zellforsch. **48**, 10—23 (1958).

Dr. med. Heinz David, Pathologisches Institut der Charité, Berlin N 4, Schumannstr. 20—21

Zeitschrift für Zellforschung 53, 55—68 (1960)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Horstmann)

ZUR HISTOPHYSIOLOGIE DES HERZBEUTELS

I. Mitteilung

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE BEOBACHTUNGEN AN DEN DECKZELLEN DES PERI- UND EPIKARDS*

Von

J. Staubesand und W. Schmidt

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. August 1960)

Einleitung und Fragestellung

Eine Bearbeitung des morphologischen Substrats für die „Ernährung" der Gefäßwand (Staubesand 1959a, b) muß Möglichkeiten und Bedeutung des transintimalen Stoffverkehrs, d.h. der Endothel-Permeabilität berücksichtigen. Jedoch erwies sich die Gefäßwand selbst aus mancherlei Gründen für ein experimentelles Vorgehen zur Prüfung dieser Frage als wenig geeignet. So wurde nach einem Modell gesucht, bei dem übersichtlichere und leichter zu beherrschende Verhältnisse vorlagen. Das sog. *Mesothel* der serösen Höhlen ist in mancher Hinsicht dem Gefäßendothel vergleichbar: Endothel wie Mesothel stellen innere Grenzflächen gegen Flüssigkeitsschichten dar. Nicht nur in den herkömmlichen Dimensionen, sondern auch elektronenmikroskopisch (Odor 1954; Fawcett 1956; Moore u. Ruska 1957; Buck 1958 u.a.) bestehen mancherlei Übereinstimmungen zwischen beiden Zellformationen. Für unsere Untersuchungen erschien der *Herzbeutel* vor allem deshalb als ein geeignetes Objekt, weil sich die Abmessung seiner mit Deckzellen überzogenen inneren Oberfläche ohne großen Aufwand ermitteln läßt, so daß auch für quantitative Erhebungen (z. B. im Zusammenhang mit der Passage markierter Substanzen) günstige Voraussetzungen gegeben sind.

In mehreren Mitteilungen sollen Befunde eines jeweils in sich abgeschlossenen Teilgebiets der Histophysiologie des Herzbeutels vorgelegt werden. Gegenstand dieses ersten Berichtes sind elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Serosadeckzellen der Herzbeutelhöhle von Ratte und Katze.

Material und Methodik

Untersucht wurden Peri- und Epikard halbwüchsiger Ratten und neugeborener sowie geschlechtsreifer Katzen. Nach Auftropfen und Injektion der Fixationsflüssigkeit (gepuffertes Osmiumtetroxyd nach Palade) in situ, wurden vom visceralen und parietalen Blatt des Herzbeutels nach etwa 2 min kleine Stückchen entnommen und in der gleichen Fixationsflüssigkeit 2 Std in der Kälte fixiert. Einbettung in Methacrylat; Anfertigung der Schnitte mit den Mikrotomen nach Porter-Blum und Fernàndez-Moràn. Die Aufnahmen wurden mit dem Siemens Elmiskop I bei 80 kV angefertigt.

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Befunde

Die Deckzellen des Cavum pericardii bilden eine *lückenlose Schicht*, die niemals durch „Stigmata", „Stomata" oder sonstige Diskontinuitäten unterbrochen ist. Gleiches gilt auch für die Pleura pericardiaca, die in einem Teil unserer Schnitte mitgetroffen war (Abb. 1). Stellenweise ist das Cytoplasma der Deckzellen zu einem schleierartig dünnen Film von etwa 500Å ausgebreitet, der tiefer liegende Zellen

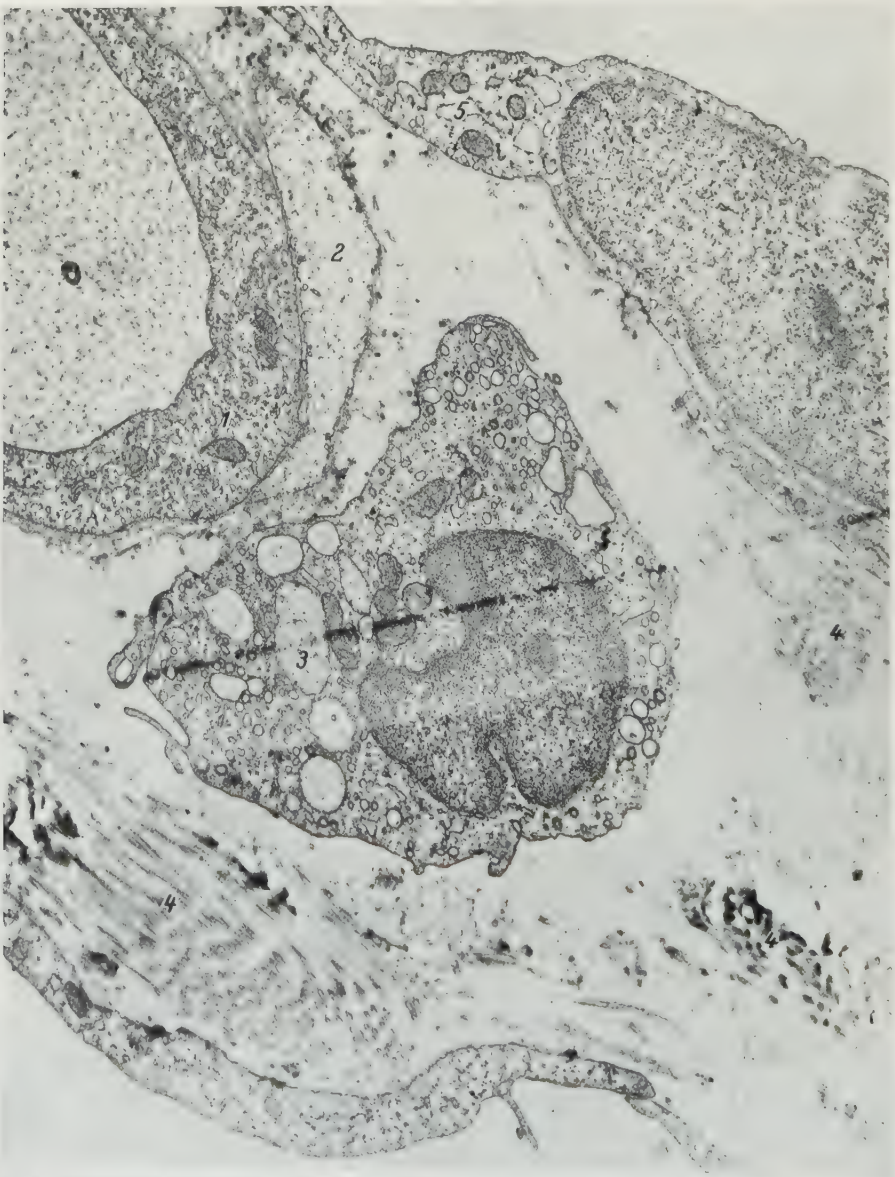


Abb. 1. Herzbeutel der Ratte: Übersicht. Deckzellen des Perikards (oben) und der Pleura mediastinalis (unten). Gesamtvergr. 12000fach. *1* Kapillarendothelzelle mit Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und zahlreichen Bläschen; *2* Perizyt; *3* Histiozyt; *4* Bündel kollagener Fibrillen; *5* endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien innerhalb einer perikardialen Mesothelzelle

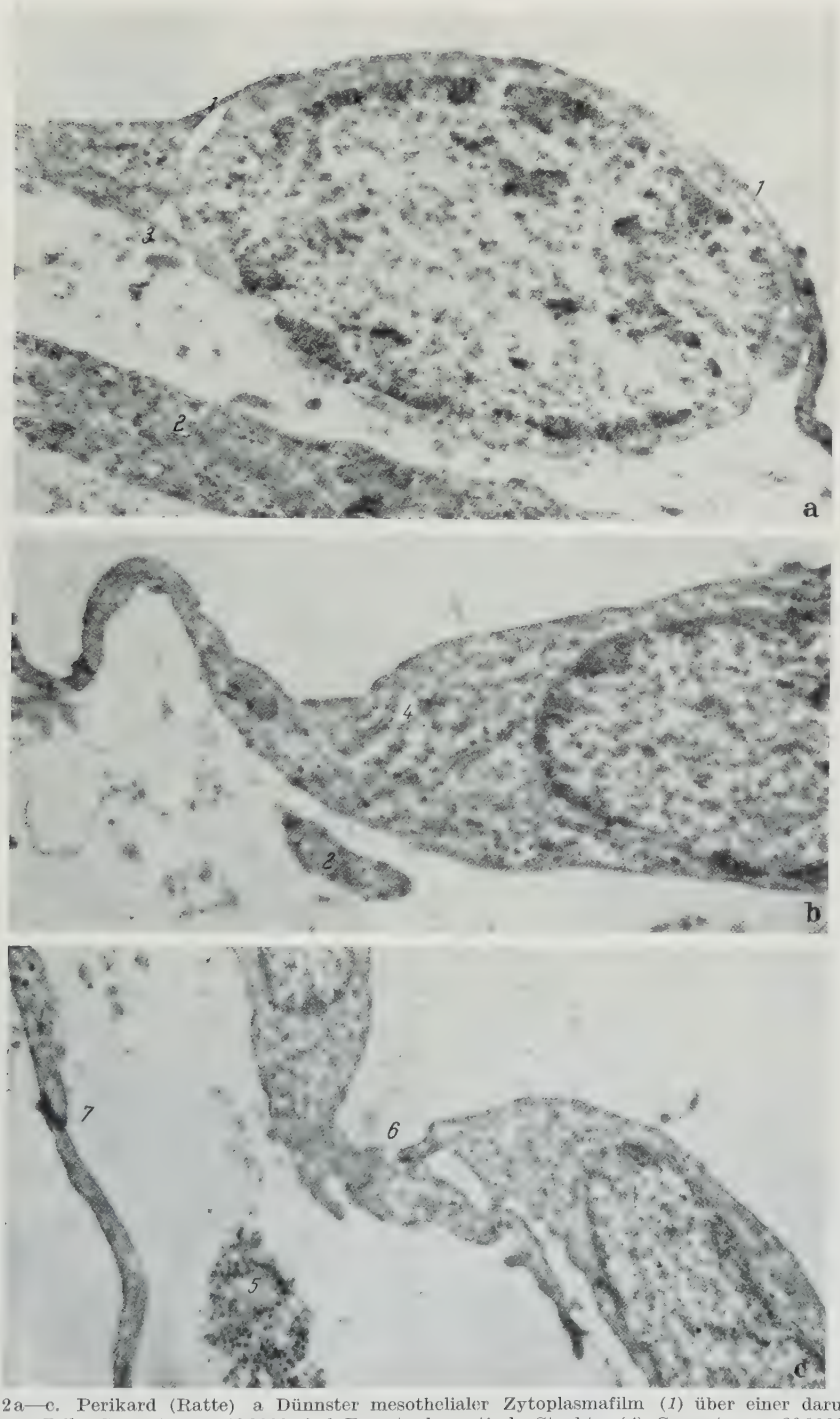


Abb. 2a—c. Perikard (Ratte) a Dünnster mesothelialer Zytoplasmafilm (*1*) über einer darunter gelegenen Zelle. Gesamtvergr. 40000fach. b Ergastoplasmatische Struktur (*4*). Gesamtvergr. 20000fach. c Weiter Interzellularraum benachbarter Deckzellen. Gesamtvergr. 20000fach. *2* Fibrozytenanschnitte; *3* Basalmembran; *5* Bündel kollagener Fibrillen; *6* Zellgrenzen des Perikards und *7* zweier Pleuramesothelzellen

gegen die Lichtung der Herzbeutelhöhle überschichtet (Abb. 2a). An der Unterfläche der Deckzellen findet sich eine *Basalmembran* (= Lamina densa), die an geeigneten Stellen eine Dreischichtung mit einer zentralen Aufhellung und je einer inneren und äußeren dunkleren Zone erkennen läßt. Am Herzbeutel der Katze ist die Basalmembran dicker als am Perikard der Ratte. — *Zellgrenzen:* Zwischen benachbarten Zellmembranen finden sich Spalträume mit einem Durchmesser von durchschnittlich etwa 150 Å. Ob es sich bei den in unseren Schnitten sehr seltenen Erweiterungen der zwischenzelligen Kontaktzone (Abb. 2c) bereits um

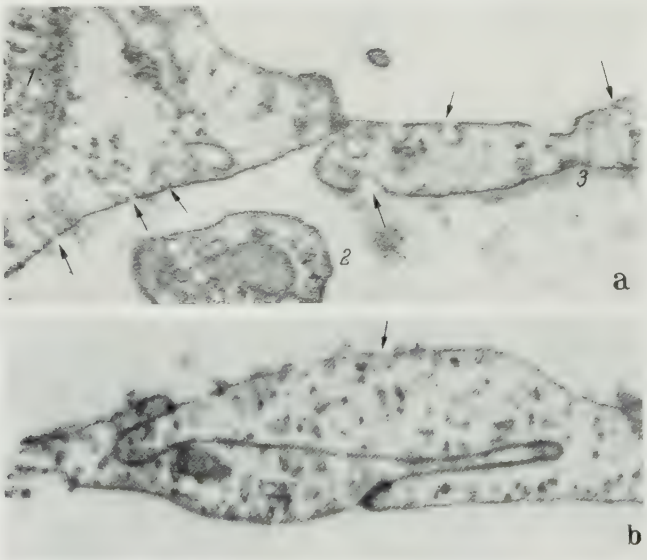


Abb. 3a u. b. Perikard (Ratte): Zellgrenzen. Gesamtvergr. a 40000fach, b 20000fach. *1* Kern einer Mesothelzelle; 2 Histiozyt, ↑↓ taschenförmige Einsenkungen bzw. sich abschnürende Bläschen an Zellober- und -unterfläche

Artefakte oder noch um natürliche Zustandsbilder handelt, läßt sich nicht mit ausreichender Sicherheit beurteilen. Die Gestalt des *Interzellularraumes* ist höchst wechselnd. Von relativ einfachen und schmalen, fast punktuellen Berührungsgebieten (Abb. 1 und 3a) bis zu den kompliziertesten Verzahnungen (Abb. 4c und 5a—c) finden sich viele Übergänge (Abb. 3b). Mitunter überlagern sich benachbarte Mesothelzellen über kürzere oder weitere Strecken hin dachziegelartig (Abb. 2c, 4a, b und 5d). Stellenweise erscheinen die Deckzellen auch mit fingerförmigen oder membranartigen Fortsätzen wie ineinandergefalzt (Abb. 4c und 5a—c).

Die *Oberfläche der Deckzellen* ist nur streckenweise glatt (Abb. 1—3), überwiegend zeigt sie jedoch einen mehr oder weniger dichten Rasen von *Mikrovilli* (Abb. 4—8). Meist erheben sich diese solitär und bilden dann einfache fingerförmige Protuberanzen (Abb. 4, 5 und 8), oder sie gehen von einer sockelförmigen Erhebung aus und verzweigen sich dann baumstrunkartig (Abb. 6a). Die Mikrovilli enthalten eine Binnenstruktur in Gestalt eines oder zweier axialer Filamente bzw. röhrchenartiger Bildungen (Abb. 4a und 9), über deren Verwurzelung uns noch keine Aussagen möglich sind.

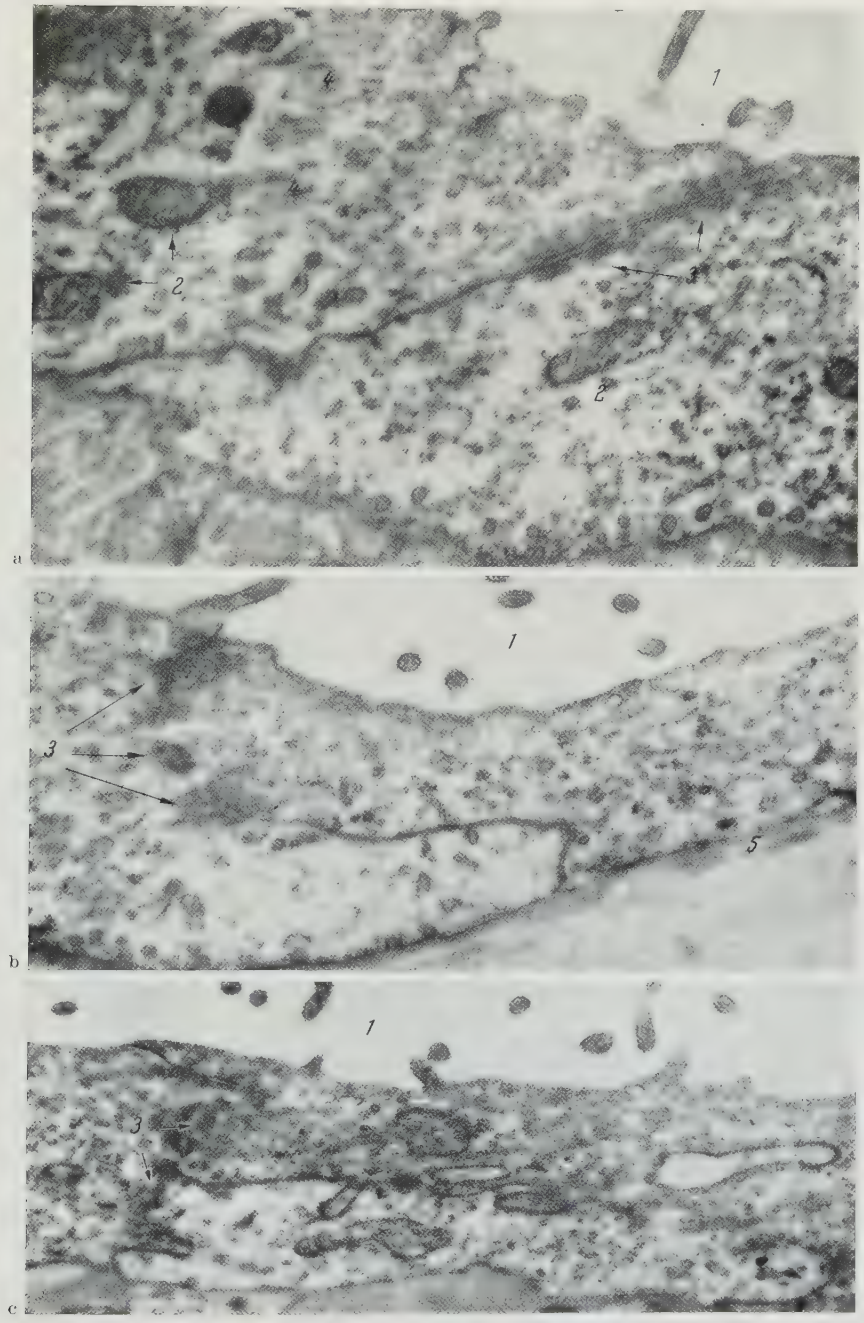


Abb. 4a—c. Perikard (Ratte): Zellgrenzen. Gesamtvergr. a—c 40000fach. a und b Dachziegelförmige Überlappungen benachbarter Mesothelzellen. c Kompliziertere Verfalzung dreier hier zusammenstoßender Zellen. Beachte bei b und c die unterschiedliche Dichte der aneinander grenzenden Zelleiber. Bei a und b zahlreiche vesikuläre Bildungen. *1* Mikrovilli; *2* Mitochondrien; *3* Haftplatten; *4* Tonofibrillen; *5* Basalmembran

Das *Cytoplasma der Mesothelzellen* des Herzbeutels besitzt zahlreiche *Palladesche Granula* (Abb. 2—8) ohne charakteristische Verteilung, typische *Mitochondrien* (Abb. 1, 4a, 5d, 7 und 8), ein sehr spärliches, in Kernnähe gelegenes

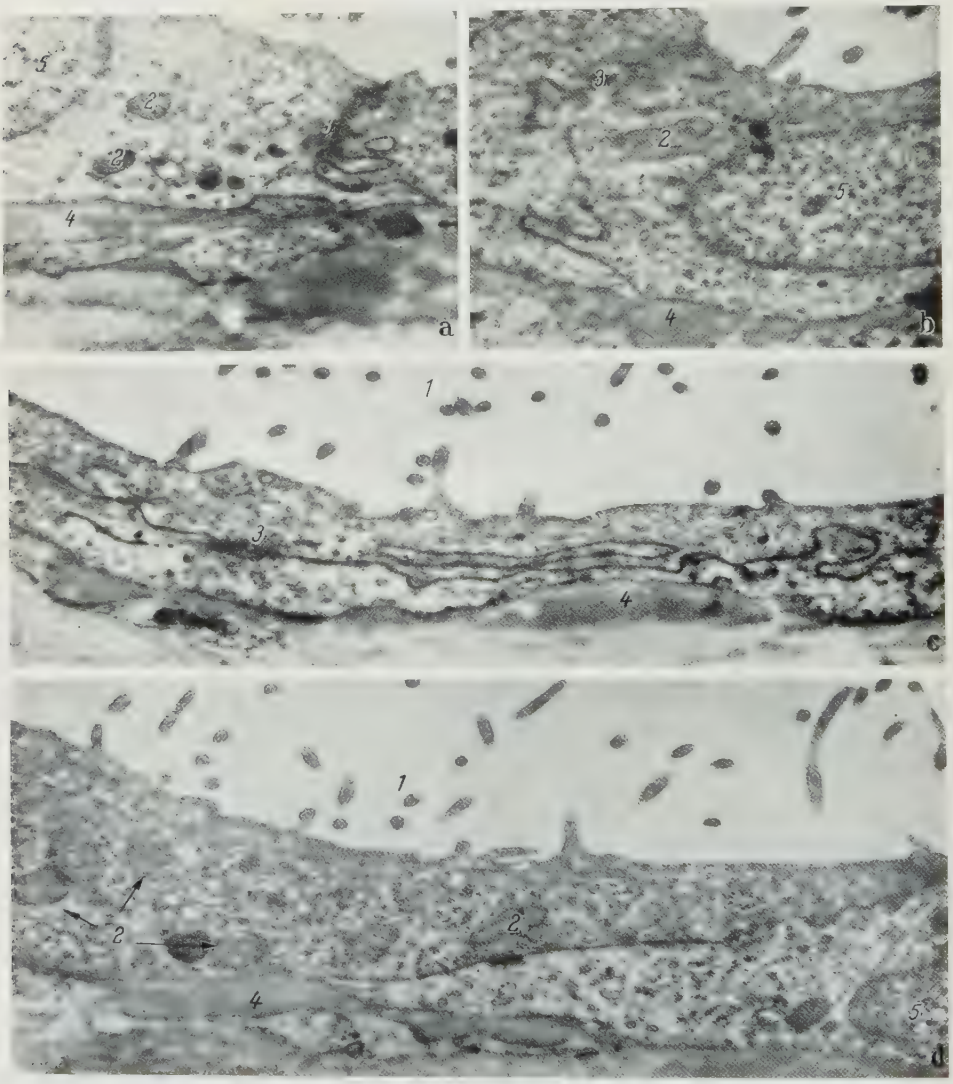


Abb. 5a—d. Perikard (Katze): Zellgrenzen. Gesamtvergr. 20000fach. a—c Verwickelter Verlauf der interzellulären Kontaktzone. d Dachziegelförmige Überlappung. Beachte die unterschiedliche Dichte der Zelleiber. *1* Mikrovilli; *2* Mitochondrien; *3* Haftplatten; *4* Basalmembran; *5* Zellkerne

endoplasmatisches Retikulum (Abb. 1), das stellenweise *ergastoplasmatische Strukturen* bildet (Abb. 2b) und filamentöse Strähnen (Abb. 4a und 8), die als *Tonofibrillen* gedeutet werden. Letztere haben einen Verlauf, der meist parallel zur Oberfläche orientiert und dem interzellulären Spaltraum zugewandt ist. Im Bereich engerer, zwischen Mitochondrien gelegener Cytoplasmastraßen konvergieren die Einzelfilamente mitunter zu dichteren Bündeln (Abb. 8). Im Zusammen-

hang mit den Tonofibrillen sehen wir örtliche Verdichtungszonen der einander zugewandten Plasmalemmata benachbarter Deckzellen (Abb. 4a—c, 5a—c, 6b und 7), die den andernorts beschriebenen *Haftplatten* oder *Desmosomen* entsprechen. Einen *Golgi-Apparat* haben wir in unseren Schnitten vermißt.

Besonders auffällig ist der Reichtum der peri- und epikardialen Mesothelien an kleineren *Vesikeln* eines Durchmessers von 400—600 Å. Die Bläschen finden

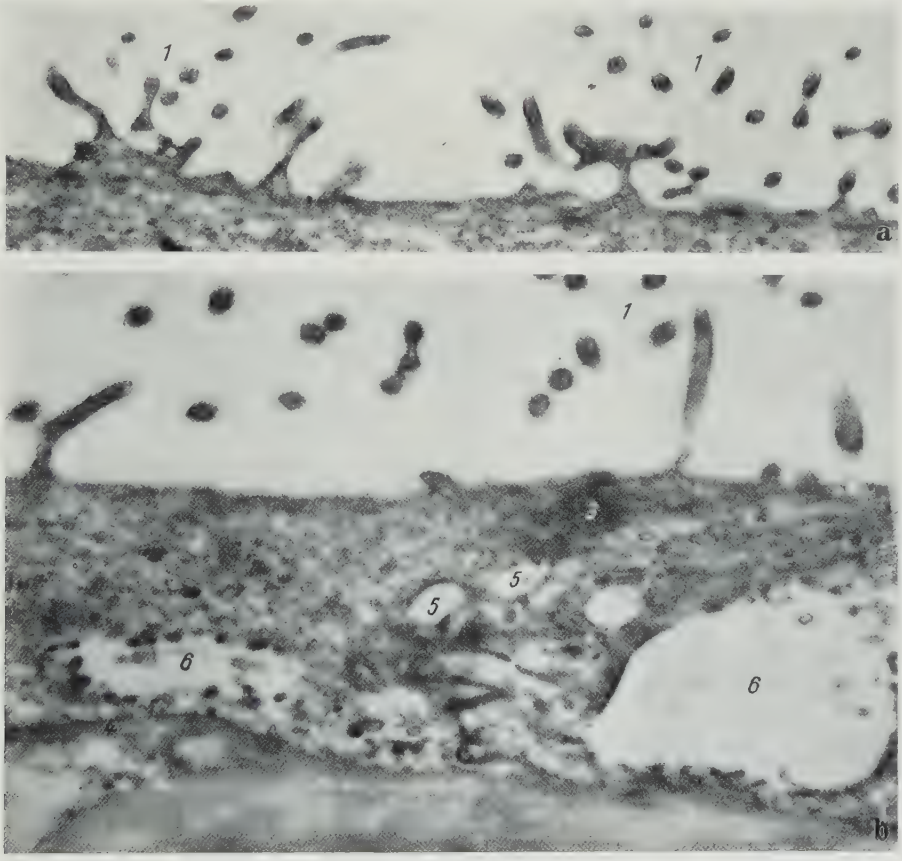


Abb. 6 a u. b. Perikard (Katze). Gesamtvergr. 22000fach. a Solitäre und baumstrunkartig verzweigte Mikrovilli. b Intrazelluläre Vakuolen. *1* Mikrovilli; *3* Haftplatte; *4* Basalmembran; *5* erweiterter Interzellularraum(?); *6* intrazelluläre Vakuolen

sich zwar allenthalben in der ganzen Dicke der Zellen, weisen jedoch zelloberflächen- wie zellbasiswärts eine Häufung auf, so daß es in diesen Bereichen zu perlschnurartigen Aggregationen kommt (Abb. 4a, b, 7 und 8). Der Bläscheninhalt ist in der unteren, basalmembrannahen Zellzone elektronenoptisch meist dichter als in den oberflächlichen Zellschichten (Abb. 4a, b und 7). Vielfach finden sich entlang der ganzen Ausdehnung des Plasmalemms grübchenförmige Einsenkungen, taschenartige Höhlungen und schon völlig abgeschnürte Bläschen (Abb. 3a). Vor allem in der Nähe der Interzellularspalten liegen stellenweise größere kavernöse Räume, deren Wände von körnig-blasigen Bildungen besetzt sein können (Abb. 6b).

Die Dichte des Cytoplasmas kann unterschiedlich sein. Dies fällt besonders bei benachbarten Zellen auf (Abb. 4b, c und 5d). — Abweichungen im Verhalten der epi- und perikardialen Mesothelzellen sind uns nicht aufgefallen. Auch bestehen offenbar keine prinzipiellen Unterschiede zwischen den Herzbeuteldeckzellen der Ratte und denen der Katze.

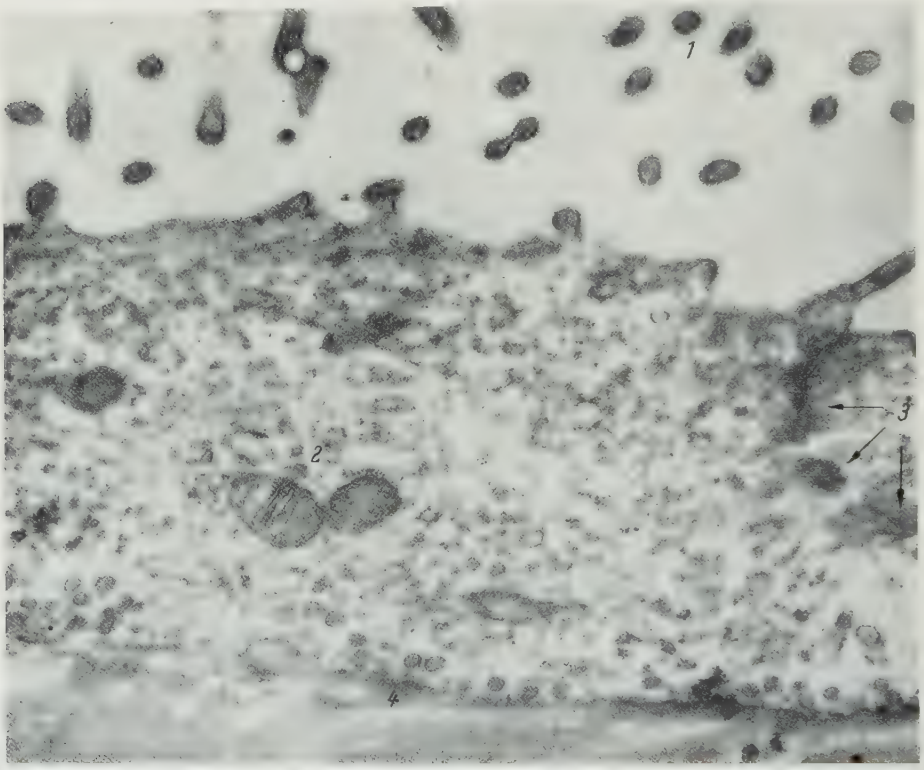


Abb. 7. Epikard (Katze). Gesamtvergr. 40000fach. *1* Mikrovilli; *2* Mitochondrien; *3* Haftplatte; *4* Basalmembran. — An der Zellbasis Bläschen mit einem dichten, homogenen Inhalt

Diskussion

Unter normalen Bedingungen bildet das Mesothel des Herzbeutels einen kontinuierlichen Belag. Diese Beobachtung stimmt mit den Befunden anderer Untersucher an den Deckzellen des Pleuroperitonaealraumes verschiedener Tiere überein (Odor 1954, 1956; Vogel 1957; Hama 1960 u.a.). Auch wir sind der Auffassung, daß das Mesothel zu einem Formwandel befähigt ist. Bislang besteht indessen kein Anhalt für die Realität gröberer Öffnungen, wie sie als „Stigmata" oder „Stomata" (v. Recklinghausen 1865; vergl. auch Cohnheim 1867; weitere Literatur u. a. bei Altschul 1954) beschrieben worden sind. Dünnste Zellfilme (Abb. 2a) müssen sich der lichtmikroskopischen Beurteilung entziehen, so daß an derartigen Stellen leicht der Eindruck einer cytoplasmatischen Diskontinuität entstehen kann. Auf die zahlreichen Forschungen, die sich mit diesem Problem auseinandersetzen (Hertzler 1901; Notkin 1924; Allen 1936, 37; Niessing 1938, 1942; Sinapius 1950 u.a.) soll jedoch erst eingegangen werden, wenn die Ergebnisse weiterer Untersuchungen vorliegen.

Der alte, durch Beobachtungen Linzbachs (1952) am Gefäßendothel wieder angefachte Streit, ob Mesothel- bzw. Endothelzellen einen *synzytialen Verband* bilden (Kolossow 1893; Muscatello 1895; Nicolas 1895; Poska-Teiss 1936, Linzbach 1952; Linzbach u. Hort 1957) oder ob sie als Einzelelemente aufzufassen seien (Lewis 1923; Cunningham 1926; Chlopin 1936/37; Baron

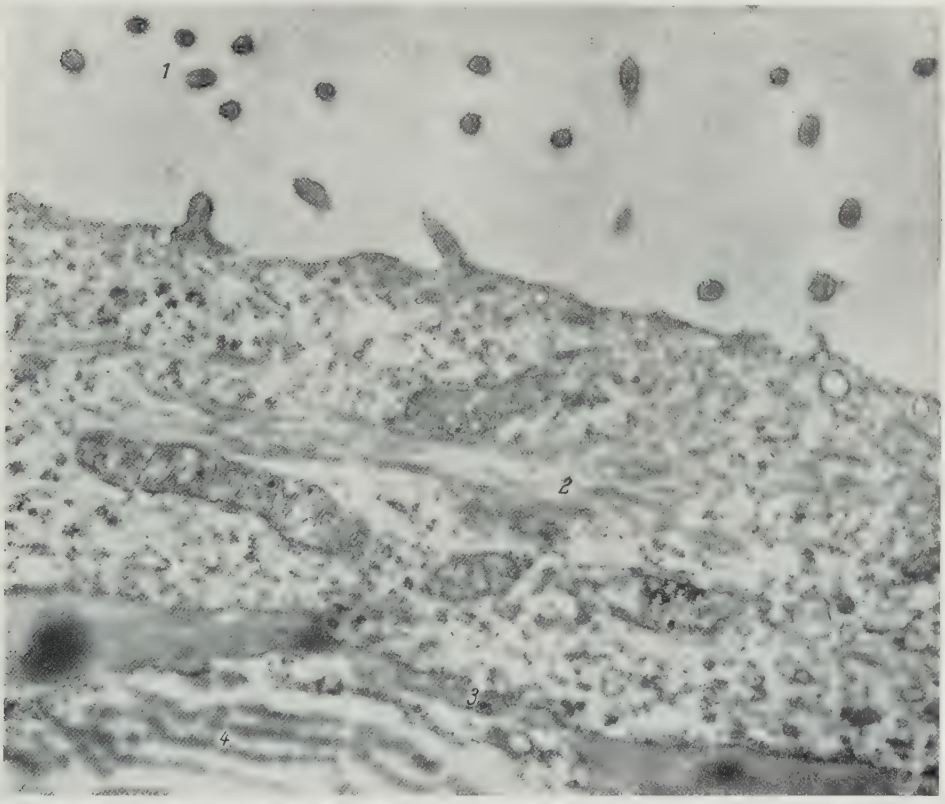


Abb. 8. Epikard (Katze): *Tonofibrillen.* Gesamtvergr. 30000fach. *1* Mikrovilli; *2* Tonofibrillensträhne umgeben von Mitochondrien; *3* Basalmembran; *4* kollagene Fibrillen

1941 u.a.) ist durch elektronenmikroskopische Befunde in dem Sinne entschieden, daß Endothelien wie Mesothelien Verbände zwar sehr dicht aneinander grenzender, aber *stets durch Interzellularräume voneinander getrennte Zellen* darstellen (Palade 1953; Odor 1954; Felix u. Dalton 1956; Sinapius u. Schrell 1956; Vogel 1957; Moore u. Ruska 1957; Kisch 1957; Buck 1958; Fawcett 1959; Hama 1960 u.a.).

Die *interzellulare Kontaktfläche* ist von einem erstaunlichen Formenreichtum, so daß es nicht leicht fällt, zu einer plastischen Vorstellung über die Gestaltung ihres Reliefs zu gelangen. Nicht nur das Kaliber des Spaltraumes (Abb. 2c und 3), sondern auch das Grenzflächenmuster selbst variieren in hohem Maße. Von fast nur punktuellen Berührungszonen (Abb. 3a) über mehr oder weniger weitreichende Überlappungen (Abb. 2c, 4a, b und 5d) bis zu den verwickeltsten Verzahnungen (Abb. 4c, 5a—c und 6b) sind zahlreiche Möglichkeiten (Abb. 3b) realisiert. Man darf sich wohl dieses Gebiet nicht als allzu starr geprägt vorstellen, sondern

muß es als eine Art *Transformationsfeld* auffassen, das sich funktionellen Gegebenheiten anzupassen vermag, so daß auch kompliziertere Verfalzungen ausgeglichen, geglättet oder vielleicht sogar vorübergehend gelöst werden können. Da mit dem fingerförmigen Ineinandergreifen benachbarter Zellen eine erhebliche Oberflächenvergrößerung der Kontaktzone einhergeht, könnte dieses Verhalten auch einen zwischenzelligen Stoffaustausch begünstigen.

Schon die älteren Untersucher haben am Mesothel des Herzbeutels bzw. der Brust- und Bauchhöhle feinste Härchen oder Bürstensäume gesehen (Kolossow 1893, Muscatello 1895, Nicolas 1895, Cunningham 1920). Andere lehnten die Existenz dieser Bildungen ab (Poska-Teiss 1936), hielten sie für Artefakte (Chlopin 1936/37) oder gingen auf das Vorhandensein oder Fehlen einer entsprechenden mesothelialen Oberflächendifferenzierung nicht ein (Norris 1908/09, Pumaala 1937, Baillif 1941, Baron 1941). Maximow (1927) diskutiert ihr allgemeines oder nur örtlich begrenztes Vorkommen und erörtert, ob sie als temporäre oder permanente Bildungen anzusehen seien.

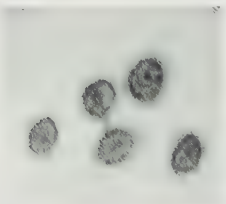


Abb. 9. Quergetroffene Mikrovilli vom Perikard (Katze). Gesamtvergr. 60 000fach. In allen Anschnitten ist die typische Binnenstruktur zu erkennen

Elektronenmikroskopisch ist der dichte Besatz von *Mikrovilli* für die Herzbeutelmesothelien der von uns untersuchten Säuger geradezu charakteristisch (Abb. 4—8). Nur hier und da fehlen sie streckenweise (Abb. 1—3). Sie gleichen in vieler Hinsicht entsprechenden fadenförmigen Erhebungen anderer und zudem höchst unterschiedlicher Standorte, wie Darmepithel (Dalton 1951), Epithel der Nierentubuli (Sjöstrand u. Rhodin 1953) und der Schilddrüse (Monroe 1953), Synzytiotrophoblast der Plazentarzotten (Bargmann u. Knoop 1959; Enders 1960) oder auch Amnionepithel (Bautzmann u. Schmidt 1960). Weitere Literaturangaben unter anderem bei Odor (1954).

Bereits Odor (1954), Policard u. Mitarb. (1955) sowie Vogel (1957) haben Mikrovilli (z.T. als „Pseudopodien" — Policard u. Mitarb. 1955) am Mesothel der Säugerbauchhöhle auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen beschrieben. Unsere Befunde unterscheiden sich nur insofern von den Beobachtungen der genannten Autoren, als die Mikrovilli der Herzbeuteldeckzellen von Ratte und Katze eine *axiale filamentöse bzw. röhrchenförmige Binnenstruktur* erkennen lassen. Wir möchten aus diesem Befund zunächst noch keine weitergehenden funktionellen Folgerungen ziehen. Es sei jedoch erwähnt, daß zu aktiver Motilität befähigte Zilien an der Peritonaealoberfläche verschiedener Kaltblüter (Frosch, Urodelen, Schildkröte) seit längerem bekannt sind (Neumann 1875, Prenant 1903, Delaney 1929). Auffällig ist es, daß Hama (1960), der neuerdings das Peritonaealmesothel von *Rana pipiens* elektronenmikroskopisch untersucht hat, an diesem Material Mikrovilli oder vergleichbare Gebilde weder beschrieben noch abgebildet hat. Eine eigene Nachuntersuchung dieser Frage an Material von *Rana esculenta* und *Bufo bufo* ist im Gange.

Die Anwesenheit von Mikrovilli wird im allgemeinen mit dem Stoffaustausch in Zusammenhang gebracht (vergl. Policard u. Baud 1958). Vieles spricht dafür, daß sie eine „fluktuierende Struktur" (Bargmann u. Knoop 1959) darstellen. Auch Gefäßendothelien können im übrigen ein Oberflächenrelief besitzen, das

mitunter an mikrovillöse Protuberanzen erinnert (Policard u. Mitarb. 1955). Es kann indessen keinem Zweifel unterliegen, daß sich das Mesothel in *dieser* Hinsicht vom Endothel — wenn auch vielleicht nur graduell — unterscheidet. Wir messen freilich dieser Differenz, die möglicherweise damit im Zusammenhang steht, daß die betreffenden Zellschichten einmal an eine gerichtet strömende und im anderen Fall an eine „ruhende" oder pendelnd zirkulierende Flüssigkeit grenzen, keine Bedeutung im Sinne eines tiefer greifenden biologischen Unterschiedes zwischen beiden Formationen zu.

Die *Mitochondrien* der Herzbeutelmesothelzellen zeigen weder hinsichtlich ihrer Verteilung noch bezüglich ihrer Zahl auffällige Besonderheiten. Sie gehören zum lamellären Typ und unterscheiden sich nicht von den Mitochondrien des Gefäßendothels der gleichen Schnitte. Wir haben den Eindruck, daß die Deckzellen des Herzbeutels der Ratte eine geringere Zahl von Mitochondrien besitzen als die entsprechenden Zellen der Katze. — Nur ausnahmsweise fanden wir Anschnitte eines *endoplasmatischen Retikulums* (Abb. 1). Auch seine *ergoplasmatische Sonderform* ist offenbar selten (Abb. 2b). Es ist noch zu prüfen, ob sich unter experimentellen Bedingungen Veränderungen dieser Strukturen ergeben. Die in unseren Schnitten so zahlreichen intrazellulären Vesikel dürfen nicht als Anteile des endoplasmatischen Retikulums aufgefaßt werden, da sie wegen ihrer in allen Schnittrichtungen stets kreisrunden Gestalt solitäre, bläschenförmige Gebilde darstellen müssen. Außerdem lassen sie an ihrer Oberfläche so gut wie niemals Paladesche Granula erkennen.

Die im Interzellularraum einander zugewandten Plasmalemmata benachbarter Deckzellen besitzen lokale Verdichtungen (Abb. 4a—c, 5a—c, 6b und 7), die den sog. *Haftplatten* oder *Desmosomen* gleichen, wie sie von Horstmann u. Knoop (1958) in der Epidermis der Ratte, Odland (1958, „attachment plaques", „intercellular contact layer") in der menschlichen Epidermis, Bargmann u. Knoop (1959) am Cytotrophoblast der Plazentarzotten des Menschen oder Bautzmann u. Schmidt (1960) am Amnion von Sauropsiden und Mammaliern beschrieben worden sind. Stellenweise wird die Einstrahlung von tonofibrillären Zügen in die Haftplattenzonen deutlich. Weder Odor (1954), Policard u. Mitarb. (1955) noch Vogel (1957), die elektronenmikroskopische Untersuchungen am Peritonaealmesothel angestellt haben, berichten über das Vorkommen entsprechender Strukturen. Dagegen hat Hama (1960) in den Deckzellen der Bauchhöhle des Frosches Tonofibrillen und Desmosomen elektronenmikroskopisch dargestellt, die sich allerdings durch ihre gleichmäßige Verteilung im Cytoplasma und durch ihren lockenförmigen Verlauf von den Tonofibrillen in den Herzbeuteldeckzellen der von uns untersuchten Spezies unterscheiden.

Das reichliche Vorkommen *vesikulärer Bildungen* im Zelleib der Herzbeutelmesothelien sehen wir im Zusammenhang mit der Aufnahme = Pinozytose (Lewis 1931, 1935/36; Palade 1953, 1956; Fawcett 1956; Odor 1956) bzw. Passage = Zytopempose (Moore u. Ruska 1957) feinster Flüssigkeitströpfchen in bzw. durch die Zellen der Deckschicht. Da der eine von uns (Staubesand) der Mesothel-Permeabilität eine besondere experimentelle Untersuchung gewidmet hat, soll dieses Problem bis zum Abschluß der betreffenden Arbeit zurückgestellt werden. Ebenfalls unberührt bleibt hier eine nähere Erörterung von Feinbau und Bedeutung der Basalmembran, deren Eigenschaften bei allen Betrachtungen über

den Stoffverkehr durch eine endotheliale bzw. mesotheliale Zellschicht Berücksichtigung finden muß (vgl. hierzu unter anderen Bargmann 1958, Fawcett 1959).

Zusammenfassung

Elektronenmikroskopische Untersuchungen am peri- und epikardialen Mesothel der Ratte und der Katze führten zu folgenden Befunden:

1. Die Deckzellen des Cavum pericardii bilden unter normalen Bedingungen einen kontinuierlichen Belag ohne „Stigmata", „Stomata" oder sonstige Unterbrechungen der cytoplasmatischen Schicht.

2. Die einzelnen Zellen sind durch Interzellularräume voneinander getrennte Elemente, die keine synzytialen Verbindungen besitzen.

3. Das Relief der interzellulären Kontaktfläche ist höchst variabel. Fast nur punktuelle Berührungszonen, mehr oder weniger weit reichende Überlappungen und verwickelte Verzahnungen lassen dieses Gebiet als ein Transformationsfeld erscheinen, in dem sich — je nach den funktionellen Erfordernissen — ein ständiger Formwandel vollziehen dürfte.

4. Typisches Merkmal der Mesothelien des Herzbeutels ist ein verhältnismäßig dichter Rasen von Mikrovilli, die sich teils solitär, teils von baumstrunkartigen Protuberanzen erheben. Sie lassen eine filamentöse bzw. röhrchenartige Binnenstruktur erkennen.

5. Das Cytoplasma der Deckzellen enthält neben gleichmäßig verteilten Paladeschen Granula, charakteristische Mitochondrien, ein spärliches endoplasmatisches Retikulum (stellenweise in der Ausprägung ergastoplasmatischer Strukturen) und Tonofibrillen, die Beziehungen zu Haftplatten (= Desmosomen) erkennen lassen.

6. Zahlreiche interzelluläre vesikulöse Bildungen unterschiedlicher Dichte stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit pinozytotischen bzw. zytopempotischen Vorgängen.

Literatur

Allen, L.: The peritoneal stomata. Anat. Rec. **67**, 89—101 (1936/37).

Altschul, R.: Endothelium; its development, morphology and pathology. New York: MacMillan Comp. 1954.

Baillif, R. N.: Reaction of the rat omentum to injections of particulate matter. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **47**, 409—414 (1941).

Bargmann, W.: Über die Struktur der Blutkapillaren. Dtsch. med. Wschr. **83**, 1704—1749 (1958).

–, u. A. Knoop: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Plazentarzotten des Menschen (Bemerkungen zum Synzytiumproblem.) Z. Zellforsch. **50**, 472—493 (1959).

Baron, M. A.: Structure of the intestinal peritoneum in man. Amer. J. Anat. **69**, 439—496 (1941).

Bautzmann, H., u. W. Schmidt: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen am Amnion von Sauropsiden und Mammaliern (Huhn, Katze, Mensch). Z. Zellforsch. **51**, 571—588 (1960).

Buck, R. C.: The fine structure of endothelium of large arteries. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 187—190 (1958).

Cunningham, R. S.: The physiology of the serous membranes. Physiol. Rev. **6**, 242 (1926).

Dalton, A. J.: Electron micrography of epithelial cells of the gastrointestinal tract and pancreas. Amer. J. Anat. **89**, 109—133 (1951).

Delaney, P. A.: On the specialized phagocytic mesothelium in the Chelonia. Anat. Rec. **43**, 65—97 (1929).

Enders, A. C.: Electron microscopic observations on the villous haemochorial placenta of the ninebanded Armadillo (Dasypus novemcinctus). J. Anat. **94**, 205—215 (1960).

Fawcett, D. W.: The fine structure of capillaries, arterioles and small arteries. In S. R. M. Reynolds and B. W. Zweifach, The microcirculation. Symposium on factors influencing exchange of substances across capillary wall. Urbana: University Illinois Press 1959.

Fawcett, W.: Observations on the submicroscopic structure of small arteries, arterioles, and capillaries. Am. Ass. Anat. 69 (1956). Abstr. Anat. Rec. **124**, 401 (1956).

Felix, M. D., and A. J. Dalton: A comparison of mesothelial cells and macrophages in mice after the intraperitoneal inoculation of melanin granules. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 109—114 (1956).

Hama, K.: The fine structure of the desmosomes in frog mesothelium. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 575—577 (1960)

Hertzler, A. E.: The morphogenesis of the stigmata and stomata occuring in peritoneal and vascular endothelium. Trans. Amer. micr. Soc. **23**, 63 (1901). Zit. nach Hama 1960.

Horstmann, E., u. A. Knoop: Elektronenmikroskopische Studien an der Epidermis. I. Rattenpfote. Z. Zellforsch. **47**, 348—362 (1958).

Kisch, B.: Der ultramikroskopische Bau der Capillarwand. Acta physiol. pharmacol. néerl. **6**, 334—338 (1957).

Kolossow, A.: Über die Struktur des Pleuroperitoneal- und Gefäßepithels (Endothels). Arch. mikr. Anat. **42**, 318—383 (1893).

Lewis, W. H.: The transformation of mesenchyme into mesothelium in tissue cultures. Proc. Amer. Ass. Anat. **39**. Abstr. Anat. Rec. **25**, 111 (1923).

— Pinocytosis. Bull. Johns Hopk. Hosp. **49**, 17—27 (1931).

— Malignant cells. Harvey Lect. **31**, 214—234 (1935/36).

Linzbach, A. J.: Vergleichende phasenmikroskopische Untersuchungen am Deckepithel der Leberkapsel und am Aortenendothel. Z. Zellforsch. **37**, 554—572 (1952).

—, u. W. Hort: Mikroskopische Untersuchungen am Gefäßendothel mit Phasenkontrast- und Auflichtverfahren. Virchows Arch. path. Anat. **329**, 669—693 (1957).

MacCallum, W. G.: On the relation of the lymphatics to the peritoneal cavity in the diaphragm and the mechanism of absorption granular materials from the peritoneum. Anat. Anz. **23**, 157—159 (1903).

Maximow, A.: Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In W. v. Möllendorffs Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. II/1. Berlin: Springer 1927.

Monroe, B. G.: Electron microscopy of the thyroid. Anat. Rec. **116**, 345—362 (1953).

Moore, D. H., and H. Ruska: The fine structure of capillaries and small arteries. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 457—461 (1957).

Muscatello, G.: Über den Bau und das Aufsaugungsvermögen des Peritonäum. Virchows Arch. path. Anat. **142**, 327—359 (1895).

Neumann, E.: Die Beziehungen des Flimmerepithels der Bauchhöhle zum Eileiterepithel. beim Frosche. Arch. mikr. Anat. **11**, 354—378 (1875).

Nicolas, M. A.: Note sur la morphologie des cellules endothéliales du péritoine intestinal. C. R. Soc. Biol. (Paris) **47**, 196—197 (1895).

Niessing, K.: Die Kontraktilität der Deckzellen des Netzes. Arch. exp. Zellforsch. **22**, 90—94 (1938).

— Biologische Reaktionsweisen der Serosaepithelien. Klin. Wschr. **21**, 432—435 (1942).

Norris, C. C.: The omentum: its anatomy, histology, and physiology in health and disease. Univ. Penn. Med. Bull. **21**, 119—127 (1908/09).

Notkin, J. A.: Die Aufsaugung in den serösen Höhlen. Virchows Arch. path. Anat. **255**, 471 (1924).

Odor, D. L.: Observations of the rat mesothelium with the electron and phase microscopes. Amer. J. Anat. **95**, 433—465 (1954).

— Uptake and transfer of particulate matter from the peritoneal cavity of the rat. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 105—108 (1956).

Palade, G. E.: Fine structure of blood capillaries. J. appl. Physiol. **24**, 1424 (1953).

— The endoplasmatic reticulum. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 85—97 (1956).

Policard, A., et C. A. Baud: Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissues. Paris: Masson & Cie. 1958.
—, A. Collet et L. Giltaire-Ralyte: Bordure superficielle de pseudopodes au niveau des cellules mésothéliales du revêtement péritonéal chez les mammifères. Experientia (Basel) **11**, 152 (1955).
Poska-Teiss, L.: Ein Beitrag zur Frage des Baues des Mesothels. Epicardialmesothel des Menschen. Z. Zellforsch. **24**, 320—335 (1936).
Prenant, M. A.: Sur la morphologie des cellules épithéliales ciliées qui recouvrent le péritoine hépatique des amphibiens. C. R. Soc. Biol. (Paris) **55**, 1044—1046 (1903).
Puumala, R.H.: Morphologic comparison of the parietal and the visceral peritoneal epithelium in fetus and adult. Anat. Rec. **68**, 327—338 (1937).
Recklinghausen, F. T. v.: Zur Fettresorption. Virchows Arch. path. Anat. **26**, 172 (1865).
Sinapius, D.: Zur Genese atherosklerotischer Frühveränderungen der Aorta. Virchows Arch. path. Anat. **318**, 316—351 (1950).
—, u. W. Schreil: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Cytoplasma des Aortenendothels. Protoplasma (Berl.) **47**, 217—235 (1956).
Sjöstrand, F. S., and J. Rhodin: The ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as reveales by high resolution electron microscopy. Exp. Cell Res. **4**, 426—465 (1953).
Staubesand, J.: Funktionelle Morphologie der Arterien, Venen und arterio-venösen Anastomosen. In M. Ratschow, Angiologie. Stuttgart: Georg Thieme 1959a.
— Über die Versorgung der Arterienwand. Anat. Anz. **107**, 332—339 (1959b).
Vogel, A.: Zur Struktur des Peritoneal-Mesothels. Experientia (Basel) **13**, 54 (1957).

Prof. Dr. med. J. Staubesand und Dr. W. Schmidt,
U.K.E. Anat. Inst., Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52

Zeitschrift für Zellforschung 53, 69—89 (1960)

Istituto di Anatomia degli animali domestici dell'Università di Torino

FORMA, GRANDEZZA E DENSITÁ DEI NEURONI DELLA CORTECCIA CEREBRALE IN MAMMIFERI DI GRANDEZZA CORPOREA DIFFERENTE*

Di

Antonio Barasa

Con 11 Figure nel Testo

(In redazione il 26. luglio 1960)

Hans Driesch per il primo dimostrò che le differenze nella grandezza del soma esistenti fra i vari animali — differenze in molti casi rilevantissime — dipendono da variazioni nel numero e non nella grandezza delle cellule.

La prova inconfutabile della costanza della grandezza cellulare fu da Driesch data con la sua celebre esperienza: in larve di Echini di valore germinale ridotto, vale a dire ottenute da blastomeri isolati da uova allo stadio a 2 e rispettivamente a 4, ad 8 blastomeri, la grandezza delle cellule è sempre la stessa; varia invece il loro numero, in misura proporzionale al valore germinale. Herlitzka (1897) pervenne alle medesime conclusioni in embrioni di tritone ottenuti da blastomeri isolati allo stadio a 2.

Per tutt'altra via G. Levi (1906) confermò la validità della legge della costanza della grandezza cellulare, con misurazioni di vari tipi di cellule in molte specie di Mammiferi di mole corporea differente. Risultò che le variazioni nella grandezza delle cellule della maggior parte degli organi sono di lieve entità, e comunque sono indipendenti dalla mole del soma. Fanno eccezione soltanto le cellule nervose, le fibre muscolari striate e le fibre del cristallino: la grandezza di questi elementi varia in proporzione alla mole somatica. Sono questi gli elementi i quali in un periodo precoce dello sviluppo si differenziano, e per questo perdono il potere di moltiplicarsi; crescono invece di volume sino al termine dell'accrescimento somatico (elementi perenni secondo Bizzozero).

La relazione tra grandezza dei neuroni e grandezza somatica fu confermata per i neuroni di Invertebrati da Enriques (1908), da Conklin (1912) e da Terni (1912). E che queste differenze sono veramente in relazione con la mole somatica, fu pure confermato dalla circostanza che sussistono, ed in misura considerevole, tra specie molto affini (Terni 1915, Stefanelli 1932, Fazio 1935, Cattaneo 1935, Spina 1951).

Però le variazioni nella grandezza delle cellule nervose in senso stretto (pericario) sono di un ordine inferiore a quelle della grandezza del soma. Il che si deve attribuire, almeno in parte, alla circostanza che la grandezza del pericario dà una rappresentazione inadeguata della massa reale del neurone.

Nei neuroni provvisti di dendriti del midollo, dell'encefalo, dei gangli viscerali, il pericario (o pirenoforo, sec. Heidenhain) rappresenta una parte relativamente molto piccola del protoplasma del neurone. Orbene, dal paragone tra specie di

* Dedicato al Prof. Giuseppe Levi per il suo 88° compleanno. Ricerche compiute con un contributo del C.N.R.

mole corporea differente, risulta che lo spessore e la lunghezza dei dendriti e l'estensione dell'arborizzazione di questi, varia in misura proporzionale alla mole somatica. Di grado altissimo è, ad esempio, la differenza nell'estensione dell'arborizzazione dendritica delle cellule di PURKINJE del cervelletto nell'uomo e nel topo (vedi G. LEVI 1925).

Anche nei neuroni dei gangli sensitivi, privi di dendriti, le differenze rilevantissime in relazione alla mole corporea non riguardano soltanto il volume del pericario, ma negli animali di grande mole (e soltanto in questi) i neuroni sono circondati da una zona fenestrata ed emettono fibre a clava terminale, oppure sottili appendici, le quali si avvolgono in complicati plessi pericellulari attorno al pericario; e lo sviluppo di queste espansioni è proporzionale alla mole del soma. Nelle specie nelle quali la massa del corpo raggiunge proporzioni gigantesche, lo sviluppo di espansioni a clava terminale e di una zona fenestrata è addirittura imponente (Orthagoriscus mola, sec. G. LEVI 1906a; Elephas indicus, sec. BUCCIANTE 1926).

La questione delle differenze di grandezza dei neuroni è complessa e non può essere svolta in modo completo in queste pagine; fu discussa già da G. LEVI (vedi la sua monografia del 1925 ed il suo Trattato di Istologia). Ricorderò soltanto quanto ha più stretta attinenza con le mie ricerche.

La grandezza del pericario è in relazione con la lunghezza del neurite (come già PIERRET, 1878, aveva supposto) e sopratutto con l'ampiezza del territorio innervato dal neurite (numero dei rami collaterali e terminali). Questo fu obiettivamente dimostrato da TERNI (1920) e più tardi confermato da ALBERTO STEFANELLI per i neuroni destinati ad innervare la coda rigenerata dei RETTILI. In relazione alla maggiore estensione del territorio che i neuriti rispettivi vengono ad innervare, le cellule dei gangli sensitivi assumono un volume triplo di quello che avevano, sì da diventare le più grandi cellule gangliari dell'organismo cui appartengono (TERNI); lo stesso vale per i neuroni radicolari del midollo lombare (A. STEFANELLI).

In questo modo ci rendiamo ragione non soltanto delle differenze esistenti nel volume dei neuroni tra animali di mole diversa, bensì anche tra i vari tipi di neuroni di uno stesso animale.

Le differenze esistenti nell'estensione dell'arborizzazione dendritica dei neuroni piramidali della corteccia nei vari animali erano ben conosciute, ma non era stata mai intrapresa una ricerca sistematica, con tecnica adatta a porre in evidenza in modo completo l'estensione dell'arborizzazione dei dendriti, col proposito di stabilire se ed in quanto queste differenze fossero in relazione con la grandezza del soma. Per questo mi proposi di paragonare, in preparati col metodo Golgi, neuroni omologhi in una zona corrispondente di corteccia cerebrale di Mammiferi di mole somatica molto differente. Ho inoltre determinato, nelle stesse specie, la densità dei neuroni per mm^3 di corteccia. Le indagini furono intraprese sovra una zona della corteccia che presumibilmente corrisponde al campo 4 di BRODMANN (area motrice) dell'uomo.

Materiale e tecnica

Ho utilizzato le specie seguenti: 1. *Mus musculus albinus;* 2. *Mus rattus albinus;* 3. *Cavia cobaya;* 4. *Lepus cuniculus;* 5. *Felis domestica;* 6. *Canis familiaris;* 7. *Homo sapiens;* 8. *Capra hircus;* 9. *Ovis aries;* 10. *Sus scrofa dom.;* 11. *Bos taurus;* 12. *Equus caballus.*

Di ciascuna specie furono esaminati vari soggetti. Il confronto dei caratteri dell'arborizzazione dendritica fu limitato alle cellule piramidali, in preparati col metodo Golgi, a preferenza con la formula di Cox; questa formula, negli animali adulti, dà risultati assolutamente costanti.

Furono da me presi in considerazione i neuroni piramidali grandi, medi e piccoli, in fette di 100—200 μ di spessore. Dai preparati delle varie specie furono eseguiti disegni, con la camera di Abbe, dei neuroni piramidali. Per la determinazione della densità dei neuroni mi sono servito di preparati col metodo Nissl. I conteggi furono eseguiti direttamente al microscopio, con oculare quadrettato, all'ingrandimento di 200×, su 15 sezioni alterne di corteccia per ogni caso esaminato. Per ogni campo microscopico ho esplorato tutto lo spessore della sezione ed ho contato solamente i neuroni nel cui nucleo era visibile il nucleolo.

Per ogni specie vennero eseguiti i conteggi in due soggetti (ad eccezione che per l'uomo). In base alla media dei valori della concentrazione cellulare riscontrati nei campi esaminati, mediante opportuni calcoli, tenendo conto dello spessore della sezione, venne determinato il numero di neuroni esistenti in 1 mm^3 di corteccia.

Grandezza e forma dei neuroni piramidali nelle diverse specie

Si distinguono in genere neuroni piramidali grandi, medi e piccoli; ed io mi atterrò a questa distinzione, sebbene tra gli uni e gli altri vi siano forme intermedie.

Roditori

Mus musculus albinus (fig. 1). Sui caratteri dei neuroni piramidali in questa specie non vi è nulla da dire dopo le magistrali ricerche di R. S. Cajal.

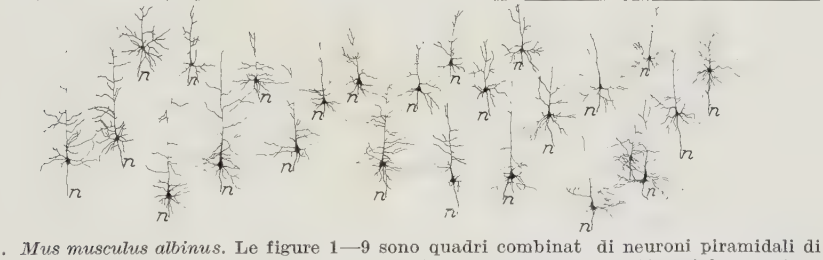


Fig. 1. *Mus musculus albinus.* Le figure 1—9 sono quadri combinat di neuroni piramidali di varia grandezza dell'area motrice della corteccia cerebrale, in specie diverse. I disegni furono ricavati da preparati impregnati con la tecnica di Golgi-Cox, sempre allo stesso ingrandimento di 30×. La linea nera rappresenta la supperficie della corteccia

Il pericario ha forma globosa o, più raramente, di piramide. Il dendrite apicale ha un decorso pressochè rettilineo e si assottiglia gradatamente in direzione distale; termina a varia altezza, affilato, oppure dividendosi in pochi e corti rami divergenti; anche lungo il tragitto fornisce un numero variabile di sottili e corti collaterali, i quali di rado si dividono ulteriormente prima di terminare (fig. 1).

I dendriti basali sono numerosi, sottili; a poca distanza dall'origine divergono a raggiera; a volte, prima di terminare, forniscono qualche collaterale. Nelle piccole e nelle medie cellule piramidali le collaterali dei dendriti apicale e basali sono relativamente più numerose che nei neuroni più grandi.

Mus rattus albinus e Cavia cobaya (fig. 2). I neuroni piramidali di ratto e cavia hanno forma simile. Si nota solamente, in tutte le categorie di neuroni, una lievissima prevalenza nel volume a favore della cavia.

La forma dei neuroni piramidali è, in queste specie, identica a quella degli elementi corrispondenti di Mus musculus, ma il pericario è un po' più voluminoso

ed il dendrite apicale molto più robusto. I rami collaterali di quest'ultimo sono più numerosi nel tratto prossimale. I dendriti basali si staccano a cono dal pericario, con base di impianto relativamente robusta; dopo breve tragitto si dividono in molti rami terminali.

Nel complesso, sia nel ratto che nella cavia, la grandezza dei neuroni piramidali è decisamente superiore a quella riscontrata in Mus musculus, per la parte che

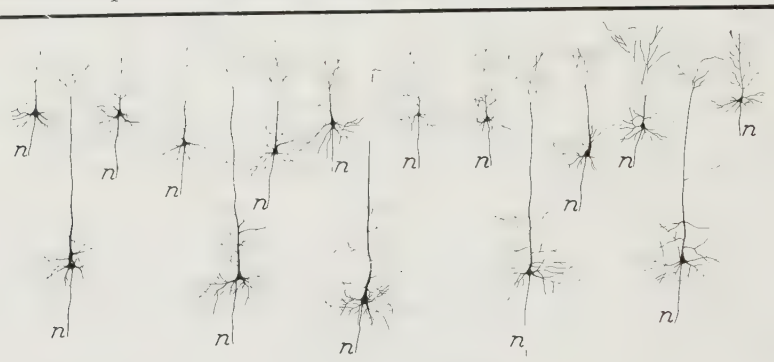


Fig. 2. *Mus rattus albinus*

Fig. 3. *Lepus cuniculus*

riguarda il pericario, ma ancor più per il numero, per lo spessore e per la lunghezza dei dendriti apicale e basali. Lo spessore veramente considerevole dei dendriti del ratto era già stato messo in evidenza da CAJAL (1909—1911).

Lepus cuniculus (fig. 3). Nei neuroni più grandi il dendrite apicale, per lo più sottile, a distanza varia dal pericario si biforca in due rami secondari divergenti; questi cedono collaterali e si dividono. A volte, specialmente nei neuroni piramidali profondi, due grossi dendriti apicali originano direttamente dal pericario (vedi fig. 3). Meno frequente è la divisione del dendrite apicale nei neuroni medi e piccoli.

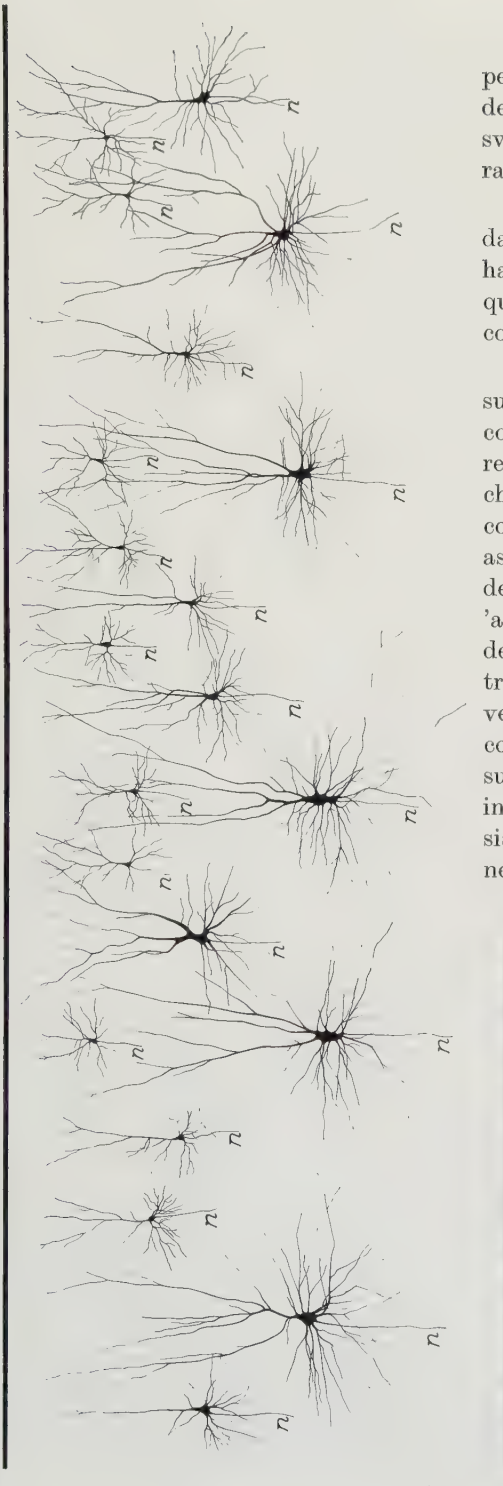
I dendriti basali, numerosi ma sottili, sono alquanto più lunghi che in ratto e cavia. Complessivamente le arborizzazioni dendritiche dei neuroni piccoli, medi e grandi sono alquanto più estese di quelle dei corrispondenti elementi del ratto e della cavia, sopratutto per il più gran numero e la maggiore lunghezza dei dendriti ascendenti e delle loro collaterali.

Carnivori

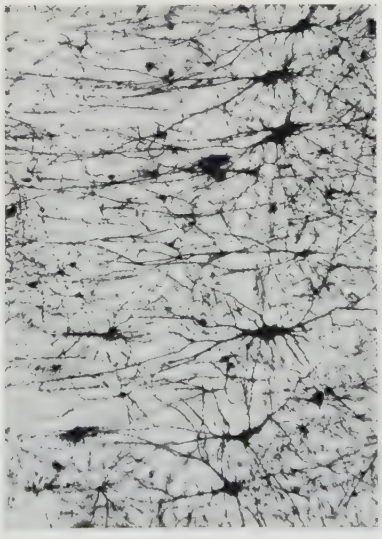
Felis domestica (fig. 4a e 4b). Il pericario è voluminoso; l'arborizzazione dendritica basale ed apicale sono ben sviluppate per lunghezza e spessore dei rami.

Nei vari tipi di neuroni piramidali, dai più piccoli ai più grandi, il pericario ha volume soltanto di poco inferiore a quello dei corrispondenti neuroni della corteccia cerebrale dell'uomo.

I dendriti basali, in numero molto superiore a quello riscontrato nel coniglio, sono lunghissimi e per lo più rettilinei; originano con un largo cono che si restringe ben tosto, per cui il contorno del pericario assume un aspetto festonato, paragonabile a quello delle foglie di agrifoglio. Sovente dall-'apice del pericario partono due grossi dendriti ascendenti, talora con un breve tronco comune; forniscono rami divergenti, i quali danno a loro volta collaterali, e ciò fino alle regioni più superficiali della corteccia; si costituisce, in tale modo, una ricca arborizzazione sia nei più grandi che nei più piccoli neuroni.



a



b

Fig. 4. a *Felis domestica*. b *Felis domestica*; area motrice. Microfoto; Golgi-Cox, ingr. 45 ×

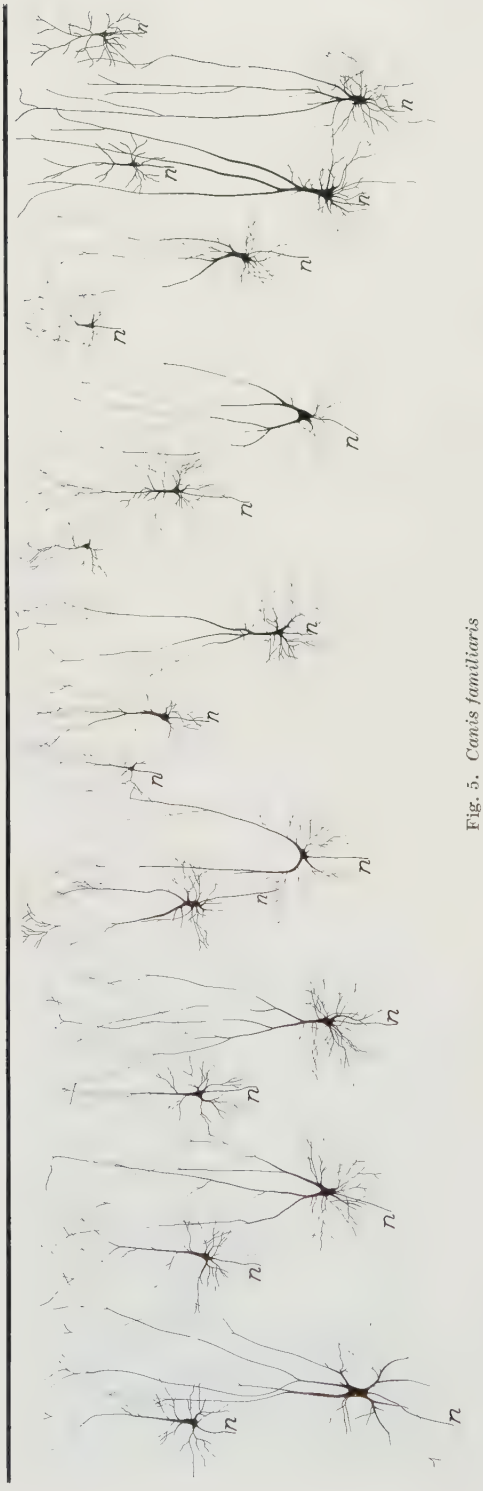


Fig. 5. *Canis familiaris*

Complessivamente, sia per la grandezza notevole del pericario, ma sopratutto per la grande estensione dell'arborizzazione fornita dai dendriti basali ed apicali, ciascun neurone piramidale del gatto ritrae una morfologia propria.

Canis familiaris (fig. 5)[1]. I neuroni piramidali medi e piccoli assomigliano, per la forma e per il volume del pericario e per lo spessore e la lunghezza dei dendriti, a quelli del gatto. La morfologia dei neuroni più grandi, invece, è quanto mai varia. Il pericario ha volume generalmente di poco inferiore a quello dei corrispondenti neuroni del gatto. I dendriti basali si dividono in molti rami un po' più corti che nel gatto. Sovente il dendrite apicale si origina come un robusto tronco, senza limiti netti dal pericario; il tronco ben presto si divide in due rami secondari divergenti, di calibro cospicuo. Questi, portandosi verso la superficie della corteccia, si suddividono in vario modo. Ne risulta un ciuffo di robusti dendriti ascendenti, per lo più senza collaterali; presso la superficie si dividono in numerosi rami terminali. Spesso, nei più grandi neuroni, due grossi tronchi ascendenti originano indipendenti dal pericario.

Nel complesso, nei tre ordini di neuroni piramidali esaminati, l'arborizzazione dendritica, specialmente quella dei dendriti basali, è un po' meno estesa che nel gatto.

[1] I disegni dei neuroni piramidali del cane furono ricavati dall'area motrice di 6 soggetti adulti, appartenenti a razze di differente peso corporeo, rispettivamente di 5,5 — 12 — 18 — 21 — 26 — 31 kg. I neuroni piramidali non presentano differenze quantitativamente apprezzabili tra i soggetti di differente mole somatica, per quanto riguarda la forma e l'estensione dell'arborizzazione dendritica.

Ungulati

Ovis aries e Capra hircus. I neuroni piramidali di queste due specie non presentano sostanziali differenze rispetto a quelli del maiale, al quale rimando. Però, in pecora e capra i neuroni piramidali di tutte le categorie sono leggermente più piccoli.

Sus scrofa domestica (fig. 6). Il pericario, relativamente piccolo, nella maggior parte dei casi ha la forma di un alto e sottile cono. Il polo superiore si continua insensibilmente nel dendrite apicale, robusto all'origine; procede indiviso verso la superficie della corteccia per un lungo tragitto, quindi fornisce rami collaterali divergenti, i quali costituiscono, nell'insieme, un pennacchio dendritico più o meno ampio a seconda dei casi, ma comunque più ricco di quello osservato nei neuroni corrispondenti dell'uomo.

I dendriti basali, piuttosto numerosi, risultano più lunghi di quelli del cane, ma meno di quelli di gatto e uomo.

I più piccoli neuroni piramidali hanno volume alquanto superiore a quelli corrispondenti di cane e gatto.

Bos taurus ed Equus caballus (fig. 7 e 8). Le differenze di forma e di grandezza dei neuroni piramidali tra queste due specie non sono molto pronunciate.

Fig. 6. *Sus crofa domestica*

Nei più grandi neuroni piramidali il robustissimo dendrite apicale si continua senza limite netto nel pericario ed ha uno spessore rilevante anche a distanza dall'origine. Non di rado si divide dopo breve tratto in grossi rami, oppure due grossi

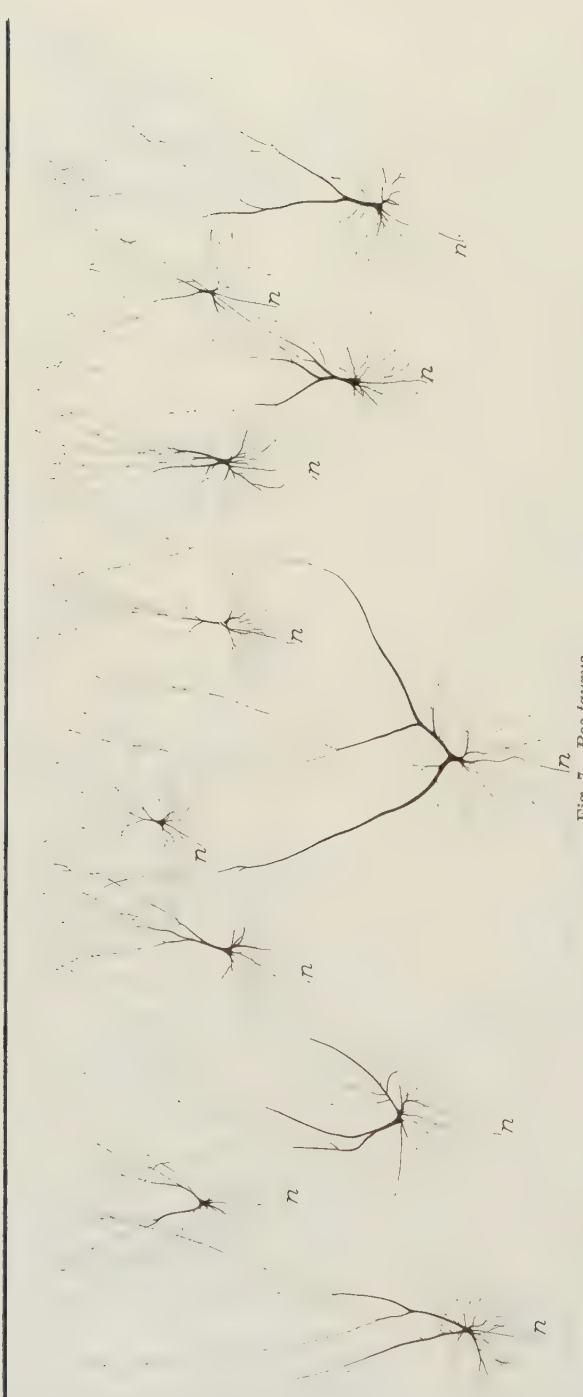


Fig. 7. *Bos taurus*

tronchi originano indipendenti; in ogni caso, per divisioni successive e per emissione di collaterali, che divergono portandosi verso la superficie, si costituisce un largo ciuffo di dendriti. Spesso l'arborizzazione dei dendriti apicali è talmente estesa da occupare complessivamente un'area a forma di piramide, con la base rivolta verso la superficie della corteccia ed il vertice a livello del pericario.

L'essere il dendrite apicale sostituito da un ciuffo di rami non è del resto un carattere esclusivo dei più grandi neuroni piramidali; se pur con estensione minore, si riscontra anche nella maggior parte dei medi e dei piccoli (vedi fig. 7 e 8).

Dal contorno del pericario originano numerosi e lunghi dendriti basali che forniscono raramente rami collaterali nel loro decorso.

Nel complesso l'arborizzazione dendritica dei neuroni piramidali del cavallo è un po' più estesa che nel bue.

Homo (fig. 9a e 9b). I neuroni piramidali della corteccia cerebrale dell'uomo furono descritti in modo esauriente da CAJAL e non vi è nulla da aggiungere alla sua esposizione.

Il pericario dei più grandi neuroni piramidali è alquanto più voluminoso che

nel bue e nel cavallo. Il dendrite apicale a volte procede senza dividersi sino alla superficie, altre volte, non molto lontano dall'origine, si divide ad angolo acuto in due rami[1] (vedi fig. 9a).

I dendriti basali sono lunghi e robusti; sono molto numerosi nelle cellule giganti (di BETZ).

Densità delle cellule nervose nell'area motrice delle diverse specie

La densità delle cellule nervose in 1 mm³ di corteccia (area motrice), determinata in preparati NISSL con la tecnica esposta a pag. 71, e riferita a tutti i neuroni di vario tipo, è riportata nella Tabella 1.

Di ciascuna specie (eccettuato l'uomo) furono esaminati due

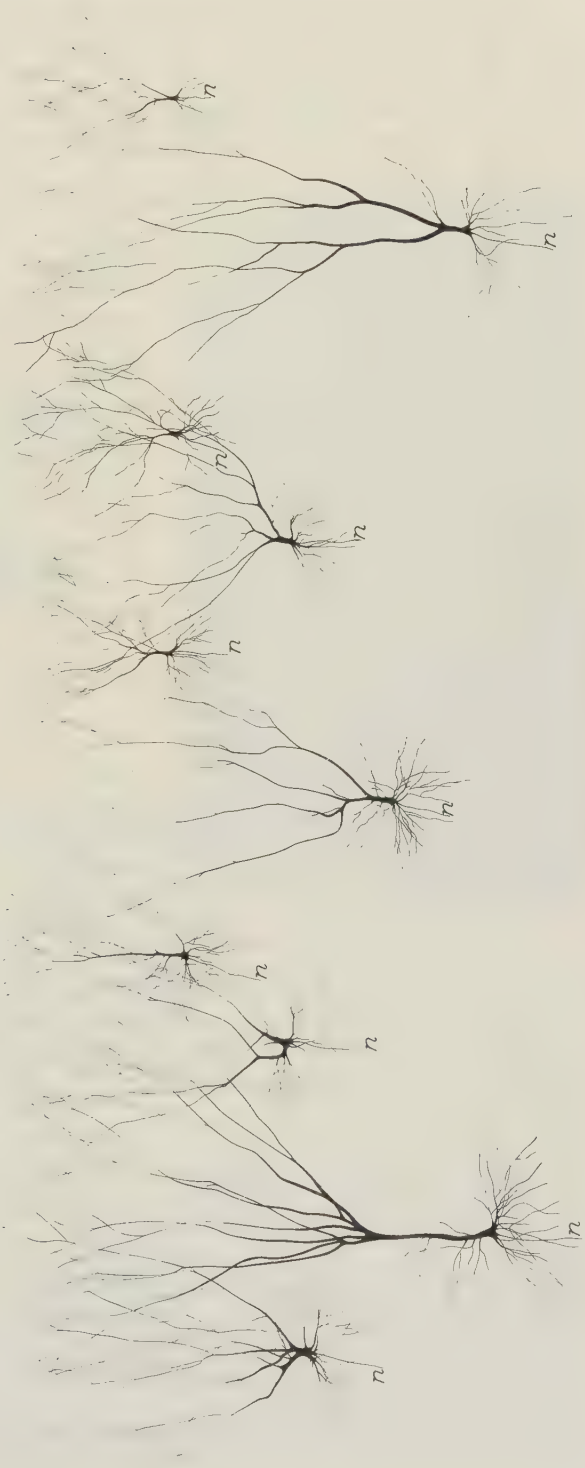


Fig. 8. *Equus caballus*

[1] In rari casi le due branche possono nascere indipendenti dal pericario ("dendrite a forca", già descritto nei neuroni piramidali dell' uomo da DE CRINIS 1933, e da SYRING 1957). Questo reperto è però contingente e molto meno frequente che in altre specie. In questi casi i due dendriti apicali procedono quasi paralleli tra di loro, verso gli strati superficiali della corteccia e forniscono alcuni rami collaterali solamente poco prima della loro terminazione (v. figura 9a).

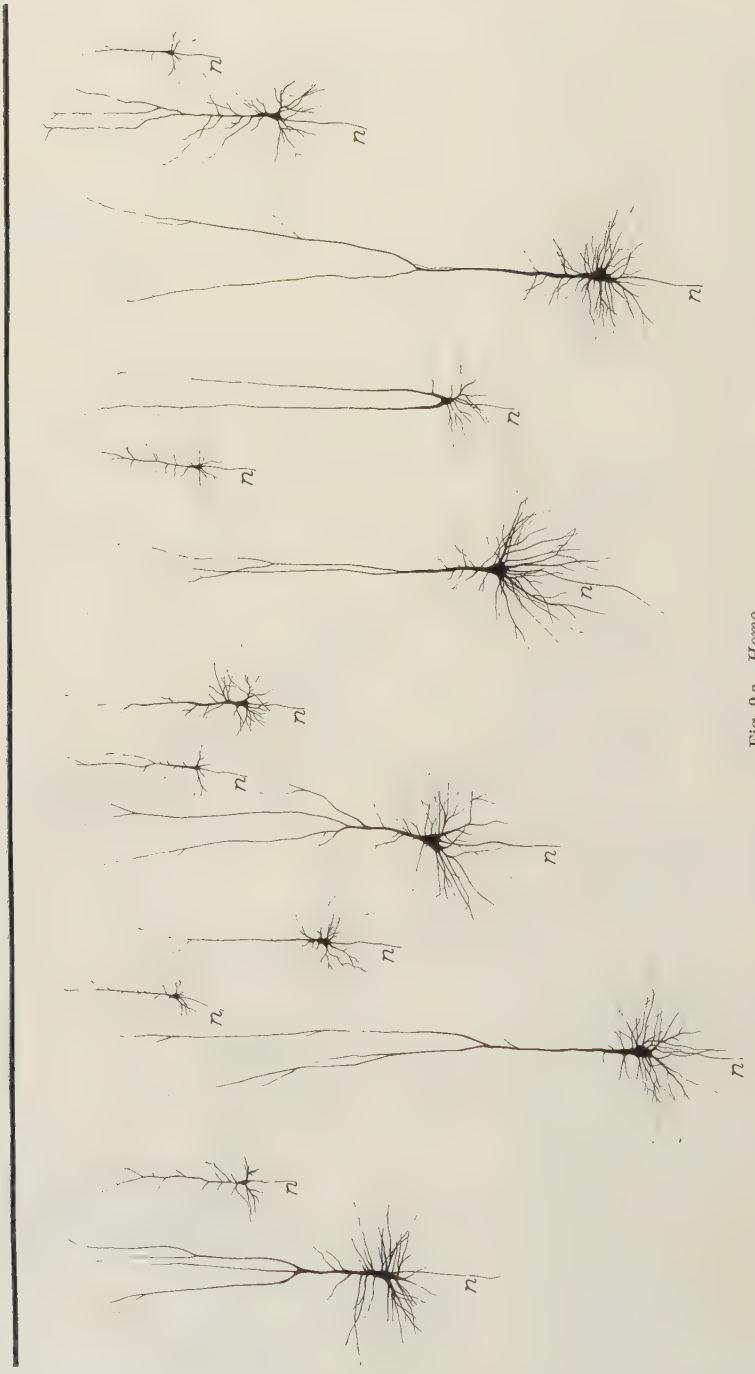


Fig. 9 a. *Homo*

soggetti (colonna I e II); nella terza colonna sono riportati i valori della media aritmetica dei due casi.

Le variazioni nella densità dei neuroni, riscontrate nei due soggetti esaminati in ogni specie, risultano di lieve entità; le differenze sono comprese tra un minimo dell'1% ed un massimo del 13%[1].

Nel cane il conteggio è stato intrapreso in due soggetti del peso rispettivo di 18 Kg. (21.600 neuroni per mm³) e di 21 kg. (19.200 neuroni per mm³) [2].

Tabella 1

	I	II	Media aritmetica
Mus musculus albinus	94.300	95.700	95.000
Cavia cobaya . . .	51.700	55.900	53.800
Mus rattus albinus .	47.700	52.700	50.200
Lepus cuniculus . .	29.400	31.100	30.250
Felis domestica . .	23.000	25.500	24.250
Canis familiaris . .	19.200	21.600	20.400
Bos taurus	16.800	18.000	17.400
Capra hircus . . .	14.400	20.000	17.200
Ovis aries	15.400	18.600	17.000
Homo sapiens . . .	16.300	—	16.300
Sus scrofa domestica	10.700	12.300	11.500
Equus caballus . . .	11.000	12.000	11.500

Fig. 9 b. *Homo*; area motrice. Microfoto; Golgi-Cox, ingr. 45 ×

Discussione

Grandezza dei neuroni piramidali in specie di mole somatica diversa

Le differenze nella grandezza del pericario tra individui appartenenti a specie di differente mole somatica sono di modesta entità, di gran lunga inferiori a quelle riscontrate nell'estensione dell'arborizzazione dendritica. Lo stesso si rileva del resto dal confronto tra i vari neuroni di uno stesso individuo. E' risultato, infatti, che in tutte e tre le categorie dei neuroni piramidali, sia i dendriti basali che quelli apicali ed anche le loro collaterali, sono più numerosi, più robusti e soprattutto più lunghi negli animali di maggior mole; però le differenze sono più spiccate nei neuroni più grandi (fig. 10 e 11). Ciò è particolarmente evidente per il dendrite

[1] A questo proposito ricordo che R. Levi Montalcini e E. Sacerdote (1934) hanno riscontrato variazioni individuali del 4,6—5,4% nel numero dei neuroni di gangli spinali corrispondenti in topi della stessa nidiata, mentre differenze molto più sensibili, comprese tra 5,9 e 25,9%, esistevano tra i gangli di topi di nidiate differenti. Rispetto a queste ultime le differenze da me riscontrate nella densità dei neuroni corticali in due individui della stessa specie appaiono contenute entro limiti relativamente modesti.

[2] La differenza di peso dei due individui è troppo lieve per permettere di istituire confronti sul rapporto esistente tra mole somatica e densità dei neuroni della corteccia nell'ambito della stessa specie. Le ricerche eseguite a tal riguardo nel cane non sono concordanti: Donaldson (1925) in due razze di cani di mole somatica differente (Terrier e Bulldog) ha riscontrato lo stesso numero di neuroni per unità di volume di corteccia, pur avendo notato una lieve prevalenza nella grandezza dei neuroni nell'individuo più grande; Volkmer (1956) invece ha riscontrato una densità cellulare leggermente superiore in un cane di piccola mole (Zwergpudel), rispetto ad uno di grande mole somatica (Königspudel).

apicale; quello robustissimo dei grossi neuroni profondi degli animali di grande mole percorre tutto lo spessore della corteccia (e tale spessore è tanto maggiore, quanto più cospicua è la mole somatica) e nel suo tragitto fornisce, per divisioni

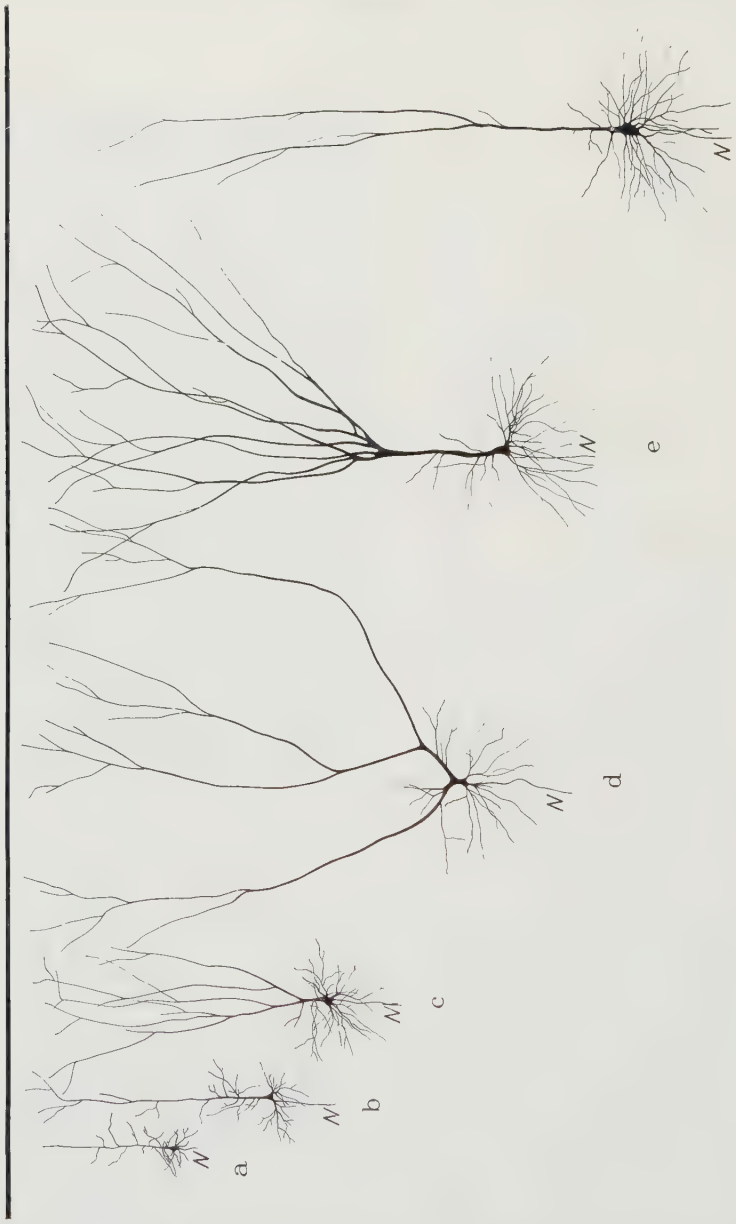


Fig. 10. Sono riprodotti, al medesimo ingrandimento (30 ×), i più grandi neuroni dello strato delle cellule piramidali profonde dell'area motrice, in animali di mole corporea differente. Le differenze tra la varie specie nella lunghezza dei dendriti e nell'estensione della loro arborizzazione, sono rilevantissime; le differenze nella grandezza del pericario sono invece di modesta entità. a *Mus musculus*, b *Mus rattus*, c *Canis familiaris*, d *Bos taurus*, e *Equus caballus*, f *Homo*

successive e per emissione di numerose collaterali, un fitto ed esteso ciuffo di dendriti ascendenti.

I più grandi neuroni piramidali del cavallo e del bue, ad esempio, hanno un pericario di grandezza soltanto di poco superiore a quello degli stessi neuroni del

cane; ma nei primi l'arborizzazione dendritica complessiva, ed in particolare il pennacchio fornito dai dendriti apicali, ha assunto un'estensione incomparabilmente più rilevante.

E' evidente quindi che il territorio nel quale si espande l'arborizzazione dendritica di ciascun neurone (territorio cellulare secondo VAN ERP TAALMAN KIP 1938[1]), è tanto più esteso quanto più grande è la mole somatica[2].

Risulta pertanto confermata, anche per i neuroni piramidali, la norma del rapporto esistente tra grandezza del soma ed estensione dell'arborizzazione dendritica[3].

Non si deve dimenticare che l'estensione dell'arborizzazione dendritica di ciascun neurone è anche in stretta relazione con la lunghezza del neurite e con l'ampiezza del territorio che esso innerva; ma una esatta valutazione della lunghezza effettiva del neurite dei neuroni piramidali delle varie specie non è attualmente possibile. Anche per i più voluminosi, il cui neurite si continua in una fibra del fascio piramidale, non sappiamo, per molte specie, in quale regione del midollo termini. Sembra accertato, a tal proposito, che esistono

Fig. 11. Sono riprodotti, allo stesso ingrandimento (30 ×), i più piccoli neuroni dello strato delle piccole cellule piramidali dell'area motrice, in animali di mole corporea differente. Tali neuroni sono tanto più voluminosi, quanto maggiore è la mole somatica. a *Mus musculus*, b *Mus rattus*, c *Canis familiaris*, d *Bos taurus*, e *Equus caballus*, f *Homo*

[1] Per VAN ERP TAALMAN KIP il territorio cellulare aumenterebbe proporzionalmente alla radice quadrata della lunghezza corporea.

[2] Vari Autori si sono proposti di determinare, nella corteccia cerebrale, quale parte del volume complessivo dei neuroni spetti al pericario e quale al complesso dei dendriti. BOK (1936) ritiene che i dendriti occupino un volume di sostanza grigia 35 volte superiore a quello occupato dal pericario; per POPE (1955) il volume complessivo dei dendriti sarebbe 5 volte superiore a quello del pericario; per SHOLL (1955) il rapporto tra la superficie complessiva dei dendriti e quella del pericario sarebbe di 9:1. Le divergenze dei dati forniti da questi Autori sono certamente da attribuire, almeno in parte, alla diversa tecnica impiegata. Su di un punto tuttavia i risultati concordano: nel dimostrare la prevalenza della massa dei dendriti su quella del pericario.

[3] Alcuni Autori (v. BONIN, BIANCHI 1943, 1951) hanno posto in dubbio la validità della correlazione esistente tra volume della parte protoplasmatica dei neuroni e mole somatica, sia per i neuroni della corteccia cerebrale, sia per quelli del PURKINJE del cervelletto. Ma occorre tener presente che questi Autori si sono limitati a considerare soltanto la grandezza del pericario senza tener conto dell'estensione dell'arborizzazione dendritica; e, come ho detto, è proprio a carico di quest'ultima che si manifestano le differenze più elevate.

La stessa obiezione è, a mio avviso, valida anche nei confronti delle ricerche di PIETROGRANDE (1943) sulle cellule del PURKINJE del cervelletto di Rettili che presentano un diverso tipo di locomozione (es. Lacerta ed Anguis). Quest'A. fa osservare che, a parità di mole somatica, le cellule di PURKINJE sono più grandi nelle specie che usano arti (es. Lacerta) rispetto a quelle striscianti (es. Anguis); e ne conclude che la grandezza di tali neuroni dipende più dal tipo di locomozione che dalla massa corporea. Ma anche in questo caso venne tenuto conto soltanto della grandezza del pericario e non dell'estensione dell'arborizzazione dendritica.

differenze molto rilevanti tra specie differenti[1]. Esistono, nell'area motrice della corteccia degli animali, cellule piramidali giganti, corrispondenti a quelle descritte nel campo IV dell'uomo da BETZ e comunemente indicate con il nome di quest'-Autore ?

E' noto che le cellule giganto-piramidali risaltano sugli altri neuroni piramidali per il volume di gran lunga superiore. A tal proposito esistono nella letteratura riguardante la corteccia di alcune specie animali solo brevi cenni. L'esistenza di cellule piramidali giganti è ammessa da HEINRICHS e KULENKAMPF (1957) nel topo, da CAMPBELL (1905) nel cane, da KINKLER e POTTER (1914) e da BONIN (1938) nel gatto, da KING (1911, a) negli Ungulati, da SCHLAPP (1903) nel pipistrello, gatto, cane e cavallo.

Densità dei neuroni nella corteccia cerebrale in specie di diversa mole somatica

Se, come risulta dalle mie osservazioni, l'arborizzazione dendritica dei neuroni piramidali della corteccia cerebrale è tanto più estesa quanto più grande è la mole corporea, è prevedibile che la densità dei neuroni per unità di volume di sostanza grigia sia inversamente proporzionale alla mole somatica. Questa previsione fu dimostrata esatta da TOWER ed ELLIOT (1952), da TOWER (1954) e da me.

Tabella 2

	Secondo TOWER ed ELLIOT	Secondo BARASA
Balaenoptera phisalus	6.800	
Elephas indicus	6.900	
Equus caballus		11.500
Sus scrofa dom.		11.500
Homo s.[2]	10.500	16.300
	e 8.750	16.300
Ovis aries		17.000
Capra hircus		17.200
Bos taurus	13.000	17.400
Canis fam.	24.500	20.400
Felis dom.	30.800	24.250
Mus musculus	142.000	95.000
Mus rattus[3]	105.000	50.200
Lepus cuniculus		30.250
Cavia cobaya[2]	52.000	53.800

Nel complesso i valori forniti da TOWER ed ELLIOT risultano alquanto più alti dei miei, fatta eccezione per l'uomo, per il bue e per la cavia. Le discordanze dipendono probabilmente dal differente metodo usato nei conteggi. TOWER ed ELLIOT eseguirono i conteggi su microfotografie, io direttamente sui preparati, nei quali più agevolmente si distinguono i neuroni dalle cellule di glia.

Riporto nella tabella 2 i valori della densità dei neuroni per mm³ di corteccia (area motrice), riscontrati da TOWER ed ELLIOT e da me.

[1] I dati della letteratura su questo particolare discordano molto. Nei Carnivori (ZIEHEN 1899, HUBER e CROSBY 1929, MANGHI 1954, FULGOSI 1956) le fibre del fascio piramidale arriverebbero fino alla porzione più caudale del midollo spinale. Negli Ungulati (DEXLER e MARGULIES 1906, KING 1911, VERHAART e SOPERS-JURGENS 1957) non oltrepasserebbero il midollo cervicale; recenti ricerche di BARONE (1960) hanno stabilito che, in cavallo, asino e bue, non si trovano più fibre del fascio piramidale oltre il 1° segmento cervicale. Tra i Roditori, nel coniglio (SWANK 1936, MANGHI 1956) si arresterebbero a livello del 2° segmento cervicale; nella cavia (MANGHI 1956) un contingente di fibre, se pur non numeroso, giungerebbe fino al rigonfiamento lombare; nel ratto (GOODMAN 1959) si arresterebbero invece al 3° segmento cervicale.

[2] Le determinazioni di TOWER ed ELLIOT riguardanti l'uomo furono effettuate nella corteccia temporale di due individui.

[3] SUGITA (1918) riferisce di aver riscontrato una densità di 80.000 neuroni per mm³ di corteccia nel ratto; PETER e FLEXNER (1950) 100.000 nella corteccia frontale di cavia.

Dall'esame del mio materiale risulta che tra animali di specie differente, ma di mole somatica pressochè uguale, a volte la densità dei neuroni è molto simile (ad es. in ratto e cavia; in pecora, capra e uomo); altre volte, invece, si hanno valori alquanto diversi (ad es. in coniglio e gatto; in vacca e cavallo). Però, anche quando si verifica quest'ultima eventualità, le differenze tra specie di grandezza corporea di poco differente non sono mai tanto rilevanti da incidere sui dati complessivi, considerati a grandi linee [1].

Del resto è molto probabile che, oltre alla mole somatica, altri fattori entrino in gioco nel determinare le variazioni di densità cellulare. Uno di questi potrebbe essere, ad esempio, una diversa percentuale, in specie differenti, dei neuroni piccoli, medi e grandi; particolare difficilmente accessibile ad un'indagine sistematica, ma che comunque non fu mai studiato.

Relazione tra grandezza, numero e densità dei neuroni in specie di mole diversa

Le variazioni quantitative nella densità dei neuroni concordano con i risultati ottenuti col metodo Golgi, e non può essere altrimenti. Quanto più estesa è l'arborizzazione dendritica dei singoli neuroni, tanto più grande è l'intervallo che separa un pericario dall'altro [2].

Ma quale relazione esiste, in animali di mole differente, appartenenti a specie diverse, tra grandezza e numero dei neuroni? Sappiamo che negli animali di maggior mole, non soltanto i neuroni sono più grandi, ma anche, in senso assoluto, più numerosi; ciò vale per la corteccia cerebrale come per altri territori nervosi.

Le condizioni che determinano la prevalenza del numero e del volume dei neuroni negli animali di maggior mole, in un determinato territorio dei centri nervosi, furono poste in luce da G. Levi (1925), peri neuroni dei gangli sensitivi, mediante il confronto tra embrioni di Mammiferi di differente mole somatica, a stadi di sviluppo approssimativamente corrispondenti. Risultò che le cellule indifferenziate dei gangli spinali si moltiplicano più attivamente (probabilmente il periodo intercinetico è più breve), e per un più lungo periodo dello sviluppo, negli embrioni di pecora che in quelli di topo. Quando la riserva degli elementi indifferenziati è esaurita e tutte le cellule del ganglio hanno assunto i caratteri specifici dei neuroblasti (comparsa delle neurofibrille), il numero definitivo dei neuroni è determinato: nell'embrione di topo di 9 mm e nell'embrione di pecora di 70 giorni. Ed a questo periodo la prevalenza nel numero dei neuroni negli animali di maggior mole è manifesta [3].

[1] Nurnberger e Gordon (1957), in palese disaccordo con i risultati di Tower ed Elliot e miei, hanno riscontrato, tra specie di mole corporea differente (Mus rattus, Macacus rhesus ed Homo) un identico numero di neuroni per unità di peso di corteccia. Però non mi sembra che la tecnica adottata da quei ricercatori (conteggio dei nuclei sovra strisci di omogenati di corteccia) possa dare risultati attendibili.

[2] Variazioni dello stesso ordine si verificano nel corso dell'accrescimento individuale. Risulta dalle ricerche di Haddara (1956) nel topo, di Brizzee e Jacobs (1959) nel ratto e di Kharetchko e Brizzee (1959) nel gatto, che nel neonato la densità dei neuroni della corteccia cerebrale è molto maggiore che nell'animale adulto.

[3] Molti anni prima Morpurgo e Tirelli (1892) dimostrarono che nei gangli spinali del coniglio il numero definitivo dei neuroni è fissato in periodi relativamente precoci della vita embrionale; Hatai (1902) lo confermò per il ratto.

L'incremento di volume dei neuroni già differenziati inizia in un secondo tempo ed è tanto più rilevante quanto più grande diviene la mole somatica dell'animale; tale incremento continua durante la vita postnatale, fino al termine dell'accrescimento.

Dal confronto eseguito da G. LEVI (1908, 1925) sull'incremento dei neuroni sensitivi spinali in quattro specie di Mammiferi (topo, pecora, scrofa e uomo) risultò che in una prima fase della vita intrauterina l'aumento di volume dei neuroni è, in tutte quattro le specie, approssimativamente uguale; una lieve prevalenza nel volume dei neuroni nelle specie di maggior mole incomincia a manifestarsi durante una seconda fase della vita prenatale, diviene rilevante già prima della nascita e si accentua nella vita postnatale.

SPINA NETTO (1951) ha calcolato il rapporto tra numero e volume dei neuroni spinali in due specie di Roditori della stessa famiglia dei Subungulata: Hydrochoerus capybara e Cavia cobaya. Il rapporto tra i rispettivi pesi corporei è di 106,6 : 1; mentre il rapporto tra le superfici corporee è di 27,4 : 1. Orbene, in queste due specie il rapporto numerico tra i neuroni del V° ganglio cervicale è di 3,34 : 1. La prevalenza del numero dei neuroni sensitivi nella specie di maggior mole appare inadeguata all'innervazione di una superficie corporea 27 volte più grande di quella della cavia. Vi è però un compenso nel maggior volume dei singoli neuroni, in media 8,2 volte maggiore in Hydrochoerus rispetto a Cavia.

Per i neuroni dei gangli spinali mi sembra quindi dimostrato che la maggior grandezza che essi raggiungono nelle specie di maggior mole vale a compensare la relativa insufficienza del numero; evidentemente in queste specie ogni neurone ha sotto le proprie dipendenze un territorio d'innervazione incomparabilmente più esteso che nelle specie di piccola mole.

Le considerazioni esposte nei riguardi dei gangli spinali sono senza dubbio valide anche per i neuroni di altri territori nervosi, compresa la corteccia cerebrale. Però lo sviluppo della corteccia è molto più tardivo di quello dei gangli ed il processo di differenziazione dei neuroni corticali molto più lento; inoltre, in questo settore, la riserva di elementi indifferenziati dello strato germinativo, i quali più tardi migrano verso la superficie, dura molto a lungo. In certe specie (pecora) ancora dopo la nascita la corteccia si arricchisce di nuovi neuroni provenienti dalla profondità, i quali si differenziano durante il lungo tragitto che devono compiere per raggiungere la sede definitiva (G. GODINA 1951).

E mi sembra ovvio che in specie di differente mole somatica, con diversa durata del periodo di accrescimento e diversa velocità di accrescimento, le variazioni nel numero definitivo dei neuroni saranno di grado più elevato in quegli organi nervosi nei quali la riserva di elementi indifferenziati dura più a lungo.

Ma nella corteccia cerebrale il problema è più complesso, in quanto nel determinismo delle differenze esistenti tra le varie specie nel numero e nella grandezza dei neuroni, coi fatti menzionati, relativi alle differenze di mole somatica, altri interferiscono in dipendenza del grado dello sviluppo psichico, il quale condiziona la posizione filogenetica delle varie specie.

Alla fine del secolo scorso DONALDSON (1897) aveva supposto che nell'uomo le differenze individuali nel peso del cervello dipendessero soltanto da differenze nel volume dei neuroni, mentre il loro numero dovrebbe essere pressochè costante.

Questa supposizione si accorda sino ad un certo punto con l'ipotesi di Dubois (1913). Questi si è proposto di integrare i dati esistenti sul numero e grandezza dei neuroni con quelli ricavati dalle determinazioni del peso del cervello in varie specie. Secondo Dubois, in individui della stessa specie, ma di differente mole, il potenziale, il quale è l'esponente delle relazioni esistenti tra peso del cervello e massa corporea, calcolato secondo la formula: $r = \frac{\log. E - \log. e}{\log. P - \log. p}$ (in cui: E, e = peso dell'encefalo dei due individui di differente mole; P, p — peso corporeo dei due individui) è di 0,31. Quest'esponente, detto ontogenetico, in base al quale procede l'aumento di peso del cervello, è molto vicino al valore del potenziale che esprime il rapporto tra le grandezze delle cellule nervose in animali di mole corporea differente, calcolato in base ai dati di G. Levi a 0,26. Dubois ne dedusse che nell'ambito della stessa specie l'aumento di peso del cervello degli individui di maggior mole dipende esclusivamente da incremento nel volume dei neuroni.

L'esponente filogenetico, invece, il quale esprime il rapporto tra i pesi del cervello in due individui di mole somatica differente, ma di specie diversa, è molto più elevato (0,56) dell'esponente delle grandezze cellulari. Secondo Dubois, nelle specie di maggior mole i neuroni sono non soltanto più grandi, ma anche più numerosi; ipotesi che si accorda coi miei risultati.

Molti anni or sono il Nissl (1898) aveva egli pure posto in risalto le differenze nella densità delle cellule nervose nella sostanza grigia dei vari animali. Ma il Nissl, tenace avversario della teoria del neurone, formulò l'ipotesi, che negli intervalli tra le cellule nervose e gliali fosse interposta una sostanza non cellulare, il "Grau", l'estensione della quale sarebbe in relazione con l'intelligenza dell'animale; il "Grau" avrebbe, nella corteccia cerebrale dell'encefalo umano, uno sviluppo molto più grande che in quella degli animali. Fondandosi su questo fatto egli ritenne che al "Grau" spettassero funzioni superiori.

L'ipotesi di Nissl fu sviluppata da v. Economo (1926) e più di recente da K. Bauer (1953) e da Haug (1953); K. Bauer attribuisce al "Grau" le funzioni di coordinazione e di integrazione.

Fin dal 1904 G. Levi sostenne che la minor densità dei neuroni nelle specie di maggior mole dipende dalla circostanza che in queste i neuroni sono più grandi e discosti l'uno dall'altro per la maggior estensione della loro arborizzazione dendritica; il chè risultò confermato dalle ricerche successive ed anche dalle mie.

E' altresì ovvio che correlativamente alla maggiore estensione della parte protoplasmatica del neurone, anche le collaterali dei neuriti afferenti ed efferenti assumono uno sviluppo via via più grande. Inoltre, recenti ricerche dimostrano che parallelamente al diminuire della densità dei neuroni, diviene in proporzione più grande il numero delle cellule di nevroglia (Friede 1954, Hawkins e Olszewski 1957).

E le recenti scoperte realizzate col microscopio elettronico hanno dimostrato che neuroni, glia e capillari sanguiferi sono anche più stipati di quanto si potesse supporre sino ad oggi. Nella corteccia cerebrale, cellule e prolungamenti cellulari contigui sono separati da sottilissimi interstizi di circa 200 Å di ampiezza (Dempsey e Wislocki 1955, Farquhar e Hartmann 1957, Schulz, Maynard e Pease 1957, Horstmann e Meves 1959, Hager, Hirschberger e Scholz 1959), quindi molto al di sotto del limite di visibilità concesso dal microscopio ottico. Questi

sottili spazi sono dello stesso ordine di grandezza di quelli esistenti in corrispondenza delle sinapsi tra bottoni terminali (e le altre forme di espansione dei neuriti) ed il pericario di un neurone. Secondo Horstmann e Meves la massa complessiva dei neuroni rappresenta il 60—65% della sostanza grigia, la massa degli elementi di nevroglia il 30%, lo spazio extracellulare il 5—7%.

Riassunto

Furono istituiti confronti, in preparati col metodo Golgi-Cox, tra i caratteri dei neuroni piramidali grandi, medi e piccoli della corteccia cerebrale di Mammiferi di grandezza somatica molto differente, e più precisamente: cavallo, bue, uomo, scrofa, pecora, capra, cane, gatto, coniglio, cavia, ratto, topo. Nell'uomo fu scelto il campo 4 di Brodmann; negli animali una regione della corteccia presumibilmente corrispondente.

Nello stesso materiale fu determinata, in preparati col metodo Nissl, la densità dei neuroni, in modo da poter stabilire il numero dei neuroni per mm^3 di corteccia.

Furono riscontrate differenze modeste nella grandezza del pericario nei vari animali, incomparabilmente meno accentuate di quelle esistenti nello stesso materiale per i neuroni sprovvisti di dendriti (gangli sensitivi). Sono invece imponenti le differenze nell'estensione dell'arborizzazione dendritica. Tali differenze sono di più alto grado nelle grandi cellule piramidali che nelle medie e nelle piccole; però sono ben evidenti anche in queste ultime.

Tra i valori ottenuti nella densità dei neuroni e quanto risulta nei preparati col metodo Golgi sull'estensione dell'arborizzazione dendritica negli animali di grandezza corporea differente, vi è coincidenza nel senso che, quanto più ampio è lo spazio occupato dall'arborizzazione dendritica dei neuroni della corteccia e quanto più numerosi sono i neuriti afferenti e le loro collaterali, tanto minore è la densità dei neuroni.

I risultati delle presenti osservazioni si accordano con i recenti reperti col microscopio elettronico, secondo i quali i neuroni, la glia ed i vasi sanguiferi sono fittamente stipati, al punto che le fessure, le quali li separano, sono dell'ordine di grandezza submicroscopica; non esistono, nei centri nervosi, altri componenti al di fuori dei neuroni, della glia e dei vasi.

Bibliografia

Barone, R.: La substance blanche et ses courants de fibres dans la moelle épinière des mammifères. Rev. med. Vét. **111**, 200 (1960).

Bauer, K. F.: Organisation des Nervengewebes und Neurencytiumtheorie. München u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1953.

Bianchi, L.: Note comparative, in cervelli umani e di scimmie, sul numero e la grandezza delle cellule in alcune aree della corteccia cerebrale. Arch. ital. Anat. Embriol. **49**, 105—160 (1943).

Bianchi, L.: La citotettonica della corteccia cerebrale. Monit. Zool. ital., Suppl. al vol. **60**, 54—86 (1951).

Boks, S. T.: A quantitative analysis of the structure of the cerebral cortex. Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch. (Amst.), Sect. II, **35**, 1—55 (1936).

Bonin, G. v.: Studies of the size of the cells in the cerebral cortex. The motor area, of man, cebus and the cat. J. comp. Neurol. **69**, 381—390 (1938).

Brizzee, K. R., and L. A. Jacobs: Postnatal changes in volumetric and density relationships in cells of cerebral cortex of white rat. Anat. Rec. **133**, 254—255 (1959).

Bucciante, L.: La struttura del ganglio del Gasser di Elefante. Arch. ital. Anat. Embriol. **23**, 691—707 (1926).

Cajal, R. S.: Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: Maloine 1909—1911.

Campbell, A. W.: Histological studies on the localisation of cerebral function. Cambridge: Cambridge University Press 1905.

Cattaneo, R.: Grandezza e numero dei neuroni sinsitivi in due anuri di grandezza corporea diversa: Calyptocephala gagy e Rana esculenta. Monit. Zool. ital. **46**, 101—107 (1935).

Conklin, E. G.: Body size and cell size. J. Morph. and Physiol. **23** (1912).

Crinis, M. de: Über die Spezialzellen in der menschlichen Großhirnrinde. J. Psychol. Neurol. (Lzp.) **45**, 439—449 (1933).

Dempsey, E. W., and G. B. Wislocki: An electron microscopy study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. J. biophys. biochem. Cytol. **1**, 245—256 (1955).

Dexler, H., u. H. Margulies: Über die Pyramidenbahn des Schafes und der Ziege. Morph. Jb. **35**, (1906).

Donaldson, H.: The growth of the brain. New York: Scribners 1897.

Donaldson, H.: Cit. da C. Ariens Kappers, The evolution of the nervous system in Invertebrates, Vertebrates and Man. Bonn: Haarlem, F. de Erven 1929.

Dubois, E.: On the relation between the quantity of brain and the size of the body in vertebrates. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **16**, 647 (1913).

Economo, C. v : Ein Koeffizient für Organisationshöhe der Großhirnrinde. Klin. Wschr. **5**, 593 (1926).

Enriques, P.: La forma come funzione della grandezza. II. memoria: Ricerche sui gangli nervosi degli invertebrati. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **25** (1908).

Erp Taalman Kip van, J.: Lichaamsgroote en Hersenschors. Groningen-Batavia: P. Noordhoff 1938.

Farquhar, M. G., and J. F. Hartmann: Neurological structure and relationships as revealed by electron microscopy. J. Neuropath. exp. Neurol. **16**, 18—39 (1957).

Fazio, C.: Numero e grandezza delle cellule nervose in larve di Anuri di diversa mole corporea. Monit. Zool. ital. **46**, 11—20 (1935).

Friede, R.: Der quantitative Anteil der Glia an der Cortexentwicklung. Acta anat. (Basel) **20**, 290—296 (1954).

Fulgosi, K. B.: Aportaciones al estudio de las vias piramidales. An. Anat. **5**, 105—116 (1956).

Godina, G.: Istogenesi e differenziazione dei neuroni e degli elementi gliali della corteccia cerebrale. Z. Zellforsch. **36**, 401—435 (1951).

Goodman, D. C.: Distribution of corticospinal fibers in the cervical region of the spinal cord of the rat. Anat. Rec. **133**, 383—384 (1959).

Haddara, M.: A quantitative study of the postnatal changes in the packing density of the neurons in the visual cortex of the mouse. J. Anat. (Lond.) **90**, 494—501 (1956).

Hager, H., W. Hirschberger u. W. Scholz: Elektronenoptische Befunde zur normalen Ultrastruktur des zentralnervösen Gewebes und zu ihrer Veränderung unter experimentell-pathologischen Bedingungen. Nervenarzt **7**, 298—305 (1959).

Hatai, S.: Number and size of the spinal ganglion cells and dorsal root fiber in the white rat at different ages. J. comp. Neurol. **12** (1902).

Haug, H.: Der Grauzellkoeffizient des Stirnhirnes der Mammalia in einer phylogenetischen Betrachtung. Acta anat. (Basel) **19**, 60—100, 153—190, 239—270 (1953).

Hawkins, A., and J. Olszewski: Glia/nerve cell index for cortex of the whale. Science **126**, 76—77 (1957).

Heinrichs, L., u. H. Kulenkampff: Die Anzahl der Betzschen Zellen. Über Rechts-Links-Unterschiede im Nervensystem der weißen Maus. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. **120**, 145—149 (1957).

Herlitzka, A.: Sullo sviluppo di embrioni completi da blastomeri isolati di uova di tritone. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **4** (1897).

Horstmann, E., u. H. Meves: Die Feinstruktur des molekularen Rindergraues und ihre physiologische Bedeutung. Z. Zellforsch. **49**, 569—604 (1959).

Huber, G. C., and E. C. Crosby: Somatic and visceral connection of the diencephalon. Arch. Neurol. psychiat. (Chicago) **22**, 187 (1929).

Kharetchko, X., and K. R. Brizzee: Quantitative morphological studies of the developing cerebral cortex in the cat. Anat. Rec. **133**, 399 (1959).

King, J. L.: The Pyramid tract and other descending paths in spinal cord. Quart. J. exp. Physiol. **4**, 133 (1911).

King, J. L.: Localisation of the motor area in the sheep's brain by the histological methods. J. comp. Neurol. **21**, 311 (1911a).

Kinkler, C., and A. Potter: An anatomical guide to experimental research on the cat's brain. Amsterdam: W. Verslnys 1914.

Levi, G.: Nuovi fatti pro e contro la teoria del neurone. Rivista sintetica e critica. Monit. Zool. ital. **15**, 130—147 (1904).

Levi, G.: Studi sulla grandezza delle cellule. I. Ricerche comparative sulla grandezza delle cellule dei Mammiferi. Arch. ital. Anat. Embriol. **5**, 291—358 (1906).

Levi, G.: La struttura dei gangli cerebro-spinali nei selaci e nei teleostei. Monit. Zool. ital. **17**, 242—248 (1906a).

Levi, G.: I gangli cerebrospinali. Studi di istologia comparata e di istogenesi. Arch. ital. Anat. Embriol. Suppl. al vol. **7**, 1—393 (1908)

Levi, G.: Wachstum und Körpergröße. Die strukturelle Grundlage der Körpergröße bei vollausgebildeten und im Wachstum begriffenen Tieren. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **26**, 187—342 (1925).

Levi Montalcini, R., e E. Sacerdote: Ricerche quantitative sul sistema nervoso di Mus musculus. Variazioni del numero dei neuroni sensitivi spinali in esemplari della stessa famiglia e della stessa specie. Monit. Zool. ital. **45**, 162—172 (1934).

Manghi, E.: Il fascio piramidale nel gatto. Monit. Zool. ital., Suppl. al vol. **63**, 228—229 (1954).

Manghi, E.: Ricerche sul fascio piramidale. I° Il fascio piramidale nella cavia e nel coniglio. Arch. ital. Anat. Embriol. **61**, 232—250 (1956).

Morpurgo, B., e V. Tirelli: Sullo sviluppo dei gangli intervertebrali del coniglio. Ann. Frenn. sc. affini, Torino, 1892.

Nissl, F.: Cit. da B. D. Tower, J. comp. Neurol. **101**, 19—46 (1954).

Nurnberger, J. I., and M. W. Gordon: The cell density of neural tissue: direct counting method and possible applications as a biologic referent. In: Ultrastructure and cellular chemistry of neural tissue, p. 100—138. New York: Waelsch 1957.

Peter, V. B., and L. B. Flexner: Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. VIII. Quantitative morphological studies on the developing cerebral cortex of the fetal guinea pig. In: Ulstrastructure and cellular chemistry of neural tissue. New York: Waelsch 1957.

Pierret, E.: Sur les relations existent entre le volume des cellules motrices et sensitives des centres nerveux et la longueur du trajet qu'on à percourir les incitations qui en émanent ou les impressions qui s'y rendent. C. R. Acad. Sci. (Paris) **86** (1878).

Pietrogrande, V.: La citoarchitettonica cerebellare dei rettili e suo rapporto con il tipo di locomozione. Arch. ital. Anat. Embriol. **48**, 300—317 (1943).

Pope, A.: The relationship of neurochemistry to the microscopic anatomy of the nervous system. In: Biochemistry of the developing nervous system. New York: Acad. Press Inc. 1955.

Schlaap, M. G.: The microscopic structure of cortical areas in man and some mammals. Amer. J. Anat. **2**, 259—281 (1903).

Schultz, R. L., E. A. Maynard and D. C. Pease: Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex and corpus callosum. Amer. J. Anat. **100**, 369—388 (1957).

Sholl, D. A.: The measurable parameters of the cerebral cortex and their significance in its organisation. In: Progress in neurobiology. Proceeding of the first internat. meeting of neurobiologists. Princeton: Elsevier Publ. Comp. 1956.

Spina Netto, F.: Dimensioni e numero dei neuroni in relazione alla mole somatica. Confronti tra due roditori di mole somatica molto differente. Z. Zellforsch. **36**, 222—234 (1951).

Stefanelli, Alberto: Costanza di numero e di forma di alcuni peculiari elementi del sistema tegmentale dei petromizonti. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **7**, 1462—1464 (1932).

Sugita Naoki: Comparative studies on the growth of the cerebral cortex. VIII. General review of data. J. comp. Neurol. **29**, 241 (1918).

Swank, R. L.: The pyramidal tract. An experimental study of the corticospinal and other components in the rabbit. Arch. Neurol. Psychiat. **36** (Chicago), 530—541 (1936).

Syring, A.: Die Verbreitung von Spezialzellen in der Großhirnrinde verschiedener Säugetiergruppen. Z. Zellforsch. **45**, 399—434 (1957).

Terni, T.: Numero e grandezza delle cellule nervose. Ricerche sulle braccia dei cefalopodi octapodi. Arch. ital. Anat. Embriol. **14**, 481—512 (1915).

Terni, T.: Sulla correlazione fra ampiezza del territorio di innervazione e grandezza delle cellule gangliari. 2° Ricerche sui gangli spinali che innervano la coda rigenerata, nei Sauri (Gongylus ocellatus). Arch. ital. Anat. Embriol. **17**, 507—543 (1920).

Tower, D. B.: Structural and functional organisation of mammalian cerebral cortex: The correlation of neurone density with brain size. Cortical density in the fin wale (Balaenoptere physalus L.) with a note on the cortical neurone density in the indian elephant. J. comp. Neurol. **101**, 19—46 (1954).

Tower, D. B., and K. A. C. Elliot: Activity of acetylcholine system in cerebral cortex of various unanestetized mammals. Amer. J. Physiol. **168**, 747—759 (1952).

Verhaart, W. J. C., and M. R. Sopers-Jurgens: Aspects of the comparative anatomy of the mammalian brain stem. Acta morph. neerl. scand. **1**, 246—255 (1957).

Volkmer, D.: Cytoarchitektonische Studien an Hirnen verschieden großer Hunde (Königspudel und Zwergpudel). Z. mikr.-anat. Forsch. **62**, 267—315 (1956).

Ziehen, T.: Zur vergleichenden Anatomie der Pyramidenbahn. Anat. Anz. **16**, 446—452 (1899).

Dr. Antonio Barasa, Istituto di Anatomia degli animali domestici, Università di Torino, Via Nizza 52, Torino (Italia)

Zeitschrift für Zellforschung 53, 90—140 (1960)

Aus dem Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg*
(Direktor: Prof. Dr. H. Lettré)
und dem Pathologischen Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler)

VITALITÄTSBESTIMMUNG DURCH AUFNAHME UND UMSATZ MARKIERTER VERBINDUNGEN**

Von

Heinrich Wrba

Mit 28 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juli 1960)

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung und Fragestellung 91
B. Material und Methode 93
1. Herkunft und Gewinnung der verwendeten Zellen und Gewebe 93
2. Methoden zur Gewinnung von markierten Zellbestandteilen (Fraktionierungsmethoden) 96
3. Technik zur Herstellung von Zellsuspensionen 98
4. Organkulturmethode 99
5. Bestimmung der Aufnahme markierter Substanz und Aktivitätsmessung 99
a) Messung der Phosphataktivität in Zellsuspensionen S. 99. — b) Messung der Phosphataufnahme an Organkulturen S. 100. — c) Messung von C-14-markierten Präparaten S. 100.
C. Versuchsergebnisse 100
1. Die Aufnahmegeschwindigkeit phosphatmarkierter Verbindungen durch Zellen des MAT in vivo 100
a) Die Beziehung zwischen dem Alter der Geschwulst und der Phosphataufnahme S. 100. — b) Die Beziehung zwischen Verwertung und Bindungsform der zugeführten Substanz S. 101.
2. Die Aufnahme phosphatmarkierter Verbindungen durch Suspensionen von Tumorzellen in vitro 104
a) Die Abhängigkeit der Aufnahme phosphatmarkierter Substanz von der Phosphatkonzentration im Medium S. 105. — b) Die Aufnahme markierter großer Moleküle und Partikel unter der Wirkung von Glucose S. 105.
3. Die Phosphataufnahme durch Organkulturen 108
a) Versuche zur Spezifität des Phosphateinbaues S. 108. — b) Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme an markiertem Phosphat durch Kulturen verschiedener Gewebe S. 109.
4. Aufnahme und Umsatz markierter Glucose durch Suspensionen von Tumorzellen in vitro 110
5. Umsatz markierter Glucose durch Zellen des MAT unter der Wirkung physikalischer und chemischer Faktoren 114
6. Vergleich der Glucoseaufnahme und Verwertung durch Zellen und Gewebe verschiedener Herkunft 116
a) Die Aufnahme durch Zellen des Sarkom 37 in Ascitesform S. 116. — b) Glucoseaufnahme durch Zellen des Yoshida-Sarkom und des Walker-Carcinom in vitro

* Der überwiegende Teil der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurde am Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg ausgeführt.

** Habilitationsschrift, auf Empfehlung der Medizinischen Fakultät der Universität München gedruckt. Die Arbeit wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

S. 117. — c) Aufnahme durch Zellen von Suspensionskulturen S. 117. — d) Bemerkungen über die Aufnahme markierter Glucose durch suspendierte Rattenleber und durch Erythrocyten der Ratte S. 118.
D. Besprechung der Ergebnisse 119
Zusammenfassung 134
Literatur 136

A. Einleitung und Fragestellung

Befunde nahezu aller naturwissenschaftlichen Disziplinen haben in den letzten Jahren die Anschauung über die Lebensfähigkeit organischer Struktur gewandelt. Die frühere Betrachtungsweise — je nach dem Standpunkt des Beschauers — den Zellbegriff morphologisch, biochemisch oder genetisch zu definieren, ist abgelöst durch eine Synthese der verschiedenen Blickrichtungen. Als Auswirkung dieser Zusammenschau ergeben sich: Tieferes Verständnis für das Gefüge der Lebensvorgänge und ihre komplexe Abhängigkeit voneinander sowie die unveränderte Schwierigkeit, die Integrität der Zelle zu definieren.

Erst mit der Einführung der Lebendbeobachtung ergaben sich für die Zellphysiologie allgemein gültige Grundsätze. Das Problem der Artefakte durch die Behandlung des zu untersuchenden Materials und die Bedeutung der Strukturen der Zelle wurden erkannt. Die Bestimmung der Kriterien des Lebens wurde auch für die einzelne Zelle anwendbar. Sie hatte als lebensfähig zu gelten, wenn sie Reizbarkeit, Bewegung, Stoffwechsel, Fortpflanzung und Formwechsel aufzuweisen hatte.

Es kam für die klassische Betrachtungsweise überraschend, daß es mit der Anwendung des Experimentes in der Zellforschung gelang, Grundfunktionen des Lebens an Strukturen zu bestätigen, die morphologisch dem Zellbegriff nicht mehr entsprachen. Zellfragmente erwiesen sich als befähigt, komplizierte Stoffwechselleistungen durchzuführen. Isolierte Zellpartikel zeigten Fermentaktivität. Die Aussage über die Integrität eines vorliegenden organischen Systems wurde komplexer. Es genügte nicht mehr, aus der morphologischen Unversehrtheit einer fixierten Zelle auf ihr vorhanden gewesenes Leben[1] zurückzuschließen. Es wurde unzulässig, aus der bestätigten Funktion einzelner Fermentsysteme, z. B. der erhaltenen Sauerstoffaufnahme oder der nachweisbaren Kontraktilität, auf die Vitalität eines Gewebes zu schließen. Nur dann, wenn bei Beobachtung des lebenden Gewebes mit Sicherheit Wachstum und Zellvermehrung nachweisbar waren, war die Aussage vorhandener Vitalität gesichert.

Für experimentelle Untersuchungen ergab sich daraus, daß nur an wachstumsfähigen Geweben eine Aussage über die Wirkung von Versuchsprozeduren mit Sicherheit zu gewinnen war. So erklärt sich, daß für die Frühentwicklung von leicht zugänglichen Kaltblütlerkeimen schon sehr frühzeitig Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Agentien vorlagen. Ähnlich war die Sachlage in der experimentellen Krebsforschung. Schon im vorigen Jahrhundert entstanden Arbeiten über die Wirkung von Versuchsmechanismen auf das Wachstum von Krebsen. Für ruhende, aber vitale Gewebe konnten Ergebnisse in dieser Richtung erst mit der Einführung der Cytochemie erzielt werden.

[1] Mit „Leben" ist im folgenden das Leben des Einzellers oder der isolierten Zelle gemeint. Regulativ organisierte Vielzeller stellen einen Sonderfall dar.

Für die lebende, unter normalen Bedingungen nicht mehr teilungs- und vermehrungsfähige Zelle mußten brauchbare Kriterien für eine Aussage über ihre Integrität gefunden werden. Neue Erkenntnisse über Herkunft und Evolution der lebenden organischen Substanz trugen zur Erschwerung einer solchen Aussage bei. Untersuchungen amerikanischer Autoren haben die frühere Auffassung über eine plötzliche sprunghafte Entstehung mit den Kriterien des Lebens versehener Substanz gänzlich unwahrscheinlich gemacht. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Entstehung des Lebens im naturwissenschaftlichen Sinne um zufällige, durch die physikalischen Bedingungen der Urwelt begünstigte chemische Umlagerungen, die unter dem entscheidenden Einfluß des Faktors „Zeit" in Jahrmillionen zu allmählicher Kondensation und zunehmender Polymerisation führten. Die entstehende organische Substanz nahm dabei die uns geläufigen Eigenschaften des Lebendigen an. Wechselwirkungen organischer Substanz mit der Umwelt führten zur Organisation. Auch dabei spielte die Zeit bei den entscheidenden Selektionierungen die größte Rolle. Beginnende Differenzierung führte zum stufenweisen Erwerb dessen, was wir als Funktion des Lebens kennen. Vor dem Beginn der eigentlichen Phylogenese liegt die biochemische Evolution (Calvin 1956, Roka 1956). Die Annahme liegt nahe, daß diese Vorgänge rückläufig ablaufend — im Zuge der Desintegration des Organischen — Stadien liefern, die die Kriterien des Lebens teilweise realisiert zeigen. Für unsere Betrachtungsweise liefern diese Zwischenstufen erhebliche Schwierigkeiten bei der Klassifizierung.

Um eine Aussage über die Vitalität bzw. den Schädigungsgrad eines zu untersuchenden Gewebes zu gewinnen, gibt es eine Reihe von Methoden, welche alle den Nachteil haben, nur eine Teilfunktion zu erfassen. Wo die Lebendbeobachtung möglich ist, ergibt sich dabei meist als sinnfälliger Ausdruck erhaltener Vitalität des Untersuchungsmaterials Bewegung, Formveränderung oder Strukturveränderung, Phagocytose und Vakuolisierung als morphologisches Äquivalent für ablaufende Stoffwechselvorgänge. Am fixierten Material wird die Aussage zweifelhafter. Morphologisch leblos erscheinende Gewebe sind unter geeigneten Bedingungen — z.B. nach Implantation — in der Lage, zu wachsen und sich zu vermehren. Zellen verschiedener Impftumoren bleiben in vitro bei Aufbewahrung im Brutschrank auch bei Sauerstoffabschluß bis zu 48 Std wachstumsfähig (Haagen und Seeger 1938, Wrba 1953, Hart und Wrba 1954, Eaton, Scala und Jewell 1959). Zellen von Impftumoren lassen sich in bestimmten Medien bei niedrigen Temperaturen über Monate lebensfähig aufbewahren (Smith 1954, Morgan, Guerin und Morton 1956, Cassel 1957). Ähnliche Ergebnisse wurden an Zellen niederer Tiere gewonnen. Auch Ovarien von Nagetieren konnten nach Einfrieren und Aufbewahrung über mehrere Monate noch mit Erfolg implantiert werden (Parkes 1957).

Auf diesen Gebieten läßt sich der Beweis erhaltener zellulärer Integrität durch die Überführung in ein geeignetes Milieu für die Vermehrung schlüssig erbringen. Eine ähnliche sehr viel schwerer zu bestätigende Sachlage ergibt sich bei der Betrachtung des überlebenden isolierten Säugetiereies. Die Eier der weißen Ratte lassen sich, wie Nicholas (1931) und nach ihm andere zeigen konnten, über mehrere Tage aufbewahren, ohne sich zu verändern und ohne ihre Vitalität zu verlieren. Nach ihrer Übertragung in einen geeigneten stadiengerechten Uterus setzt die normale Entwicklung ungestört ein (Chang 1948).

Zur Vermehrung befähigte Zellen können also unter geeigneten Versuchsbedingungen direkt auf ihre erhaltene Wachstumsfähigkeit geprüft werden. Viel schwieriger ist die Sachlage bei Verwendung ausdifferenzierter Organzellen. Ein sicheres Kriterium für die Vitalitätslage solcher Zellen gibt es nicht. Manometrische Sauerstoffumsatzbestimmung, Vitalfärbung, Fluoroskopie, cytochemische Untersuchung und biochemische Analyse liefern jeweils nur einen Hinweis auf die Funktion eines Teiles der Lebensprozesse. Häufig ist die Anwendung dieser Methoden oder auch nur einer von ihnen nicht möglich oder mit irreversibler Schädigung des Objektes verbunden.

Der direkte Nachweis vorhandener Vitalität ist an der lebenden Zelle, an der eine direkte Beobachtung von Lebensvorgängen nicht möglich ist, nur durch die Bestätigung erhaltener stofflicher Syntheseleistung durchführbar. Die Synthese zelleigener Stoffe aus Bausteinen oder Vorläufern ist an die regelrechte Funktion zahlreicher ineinander greifender Fermentsysteme gebunden. Eigene Untersuchungen haben die hohe Überlebensfähigkeit von Geweben einerseits und eine strenge spezifische Abhängigkeit für die Aufnahme und Verwertung angebotener Verbindungen ergeben (Lettré, Wrba und Seidler 1955, Hart und Wrba 1954, Wrba und Kalb 1959a, Wrba, Ripoll-Gomez und Ranz 1960).

Die Spezifität der Stoffaufnahme, ihre Abhängigkeit von der Stoffwechsellage der verwendeten Zellen und ihre Beeinflußbarkeit durch Hemmwirkungen lieferte einen Hinweis dafür, daß die Größe des Einbaues und Umsatzes geeigneter radioaktiv markierter Substanz als Maßstab für die Bestimmung der Vitalität zu untersuchender Zellen brauchbar sein mag. Von Vorteil ist dabei, daß unwägbare Mengen physiologischer mit Isotopen gekennzeichneter Verbindungen methodisch leicht nachweisbar werden. Durch Aufnahme und Einbau solcher Substanzen wird keine Störung im Zellstoffwechsel hervorgerufen. Anorganisches Phosphat z. B. wird durch Zellen im gleichen Maße aufgenommen wie das gleiche Ion innerhalb der Zelle organisch gebunden wird. Seine Aufnahme muß daher der Aktivität der Phosphorylierungsprozesse der untersuchten Zellen entsprechen.

Die vorliegende Arbeit versucht, durch Bestimmung der Größe von Aufnahme, Umsatz und Einbau geeigneter markierter Substanzen durch Zellen und Gewebe verschiedener Herkunft, eine Aussage über verschiedene Bereiche des Zellstoffwechsels und der zelleigenen Synthese zu ermöglichen. Durch dosierbare Schädigung, z. B. Röntgenstrahlen, soll eine Vitalitätsminderung der zu untersuchenden Zellen hervorgerufen werden. Anschließend soll versucht werden, diese Wirkungen durch die Beurteilung des Isotopenumsatzes zu objektivieren. Auch die Hemmwirkung, welche nach Blockierung eines Teiles des Zellstoffwechsels, etwa nur der Atmung, eintritt, soll mit Hilfe unserer Methode bestimmt werden. Durch Auswahl geeigneter Verbindungen lassen sich verschiedene Teilfunktionen, z. B. Membranfunktion, Atmungskettenphosphorylierung, Glykolyse auf ihre Intaktheit prüfen.

B. Material und Methode

1. Herkunft und Gewinnung der verwendeten Zellen und Gewebe

Die Aufnahme von markierter Substanz wurde am Ehrlichschen Mäuseascitestumor im vivo untersucht. In vitro wurde der Umsatz markierter Substanz an Suspensionen von Ascitestumoren bestimmt. An Mäusetumoren: Ehrlich-Tumor, Sarkom 37. An Rattengeschwülsten: Yoshida-Sarkom, Walker-Carcinom.

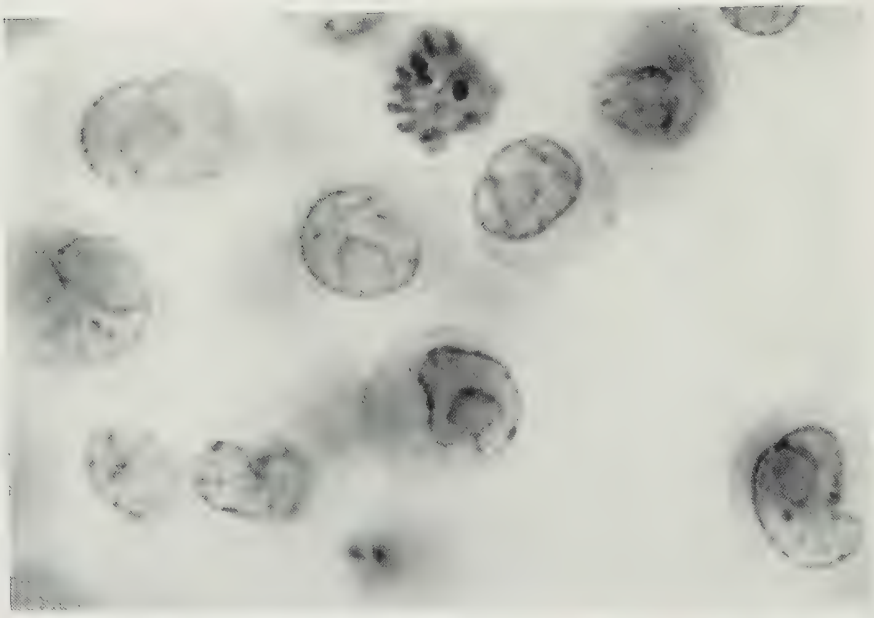


Abb. 1. Zellen des Yoshida-Sarkom in Ascitesform. (Carmin-Orcein-Färbung, Vergr. 2000mal)

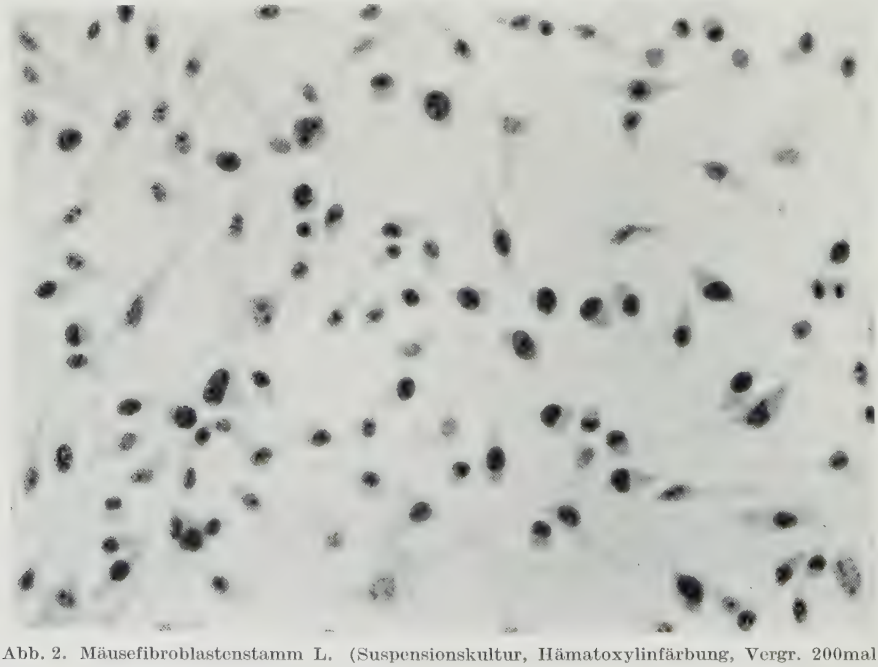


Abb. 2. Mäusefibroblastenstamm L. (Suspensionskultur, Hämatoxylinfärbung, Vergr. 200mal)

Vergleichsweise wurden Suspensionen von Rattenleberzellen und Rattenerythrocyten verwendet, daneben Suspensionen von Kulturen des Fibroblastenstammes L und von Amnionzellen des Stammes A 4. Organkulturen wurden von erwachsenen und embryonalen Lebern, Nieren und Herzen von Ratten sowie vom soliden Walker-Carcinom der Ratte hergestellt.

Ascitestumorzellen stellen ideale Objekte für Untersuchungen dieser Art dar. Alle Zellen befinden sich in der gleichen Stoffwechsellage und werden durch Änderungen der Milieubedingungen in genau der gleichen Weise getroffen. Dazu kommt, daß für die Herstellung von Suspensionen in vitro praktisch jedes Trauma entfällt und daß durch Einstellung der Zellzahl die Ergebnisse leicht quantitativ auswertbar werden.

Vom Ehrlichschen Mäuseascitestumor (MAT) verwendeten wir den sog. „alten Stamm", der am Heidelberger Institut für experimentelle Krebsforschung seit über 10 Jahren gehalten wird. Das Mäusesarkom 37 wurde in Ascitesform übergeführt. Es ist in dieser Form in seinem Wachstumsverhalten und seiner Biologie dem MAT sehr ähnlich. Von den Rattentumoren ist sowohl das Yoshida-Sarkom als auch das Walker-Carcinom in Ascitesform übergeführt worden. Das Yoshida-Sarkom dieser Asciteslinie wächst auch auf Mäusen mit guter

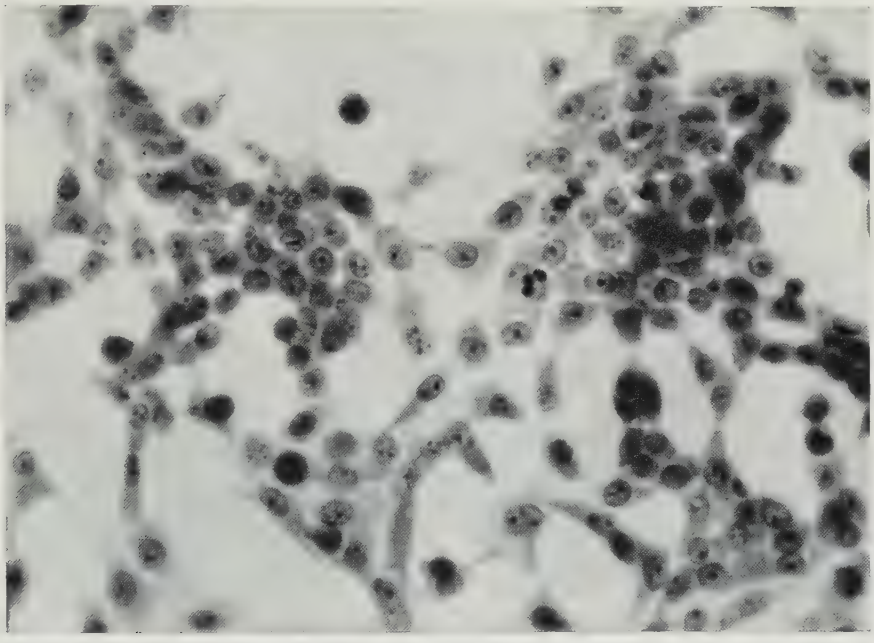


Abb. 3. Menschliche Amnionzellen des Stammes A 4. (Suspensionskultur, Hämatoxylinfärbung, Vergr. 200mal)

Ausbeute (Wrba 1960a). Das verwendete Walker-Carcinom zeigt in dieser Asciteslinie biologische Besonderheiten und ist spontan auf Mäuse und Goldhamster transplantabel (Wrba 1959). Die cytologischen Kennzeichen und biologischen Eigenheiten dieser Linie sind eingehend beschrieben (Wrba und Ripoll-Gómez 1960).

Die Zellen des verwendeten Yoshida-Sarkoms in Ascitesform sind unterschiedlich. Ein Zelltyp ist kleiner, hat einen zentralen chromatinreichen Kern und wenig Cytoplasma. Die zweite Zellart ist teilweise wesentlich größer, hat bizarre polymorphe Kerne und reichlich Cytoplasma. Häufig finden sich bei dieser Zellart mehrere kleine Kerne. Die Nucleolen sind groß und meist nur in der Einzahl vorhanden (Abb. 1).

Der Stamm L, ein Stamm von Mäusefibroblasten, der von Sanford, Earle und Likely (1949) eingeführt wurde, wird bei uns in Form der sog. Suspensionskultur seit mehr als 2 Jahren gehalten. Unser Stamm wächst auf einem Medium, das zu 20% Kälberserum, 10% Embryonalextrakt des 10 Tage bebrüteten Hühnchens und zu 70% Hanks-Lösung enthält. Die Zellen wachsen dabei isoliert auf dem Boden geeigneter Glasgefäße und bilden im Zuge ihrer Proliferation einen festhaftenden gleichmäßigen Zellüberzug (Abb. 2). Bei der Erneuerung des Nährmediums werden die Zellen jeweils durch eine Trypsinlösung (0,25%) abgelöst und mit neuem Nährmedium angesetzt.

Die Zellen des Stammes A 4 entstammen menschlichem Amnionepithel (ZITCER und DUNNEBACKE 1957). Sie sind durch Trypsinierung des nativen Gewebes und durch Selektionierung der unter den Bedingungen der Kultur vermehrungsfähigen Zellen gewonnen worden (DUNNEBACKE und ZITCER 1957). Es handelt sich dabei um schnellwachsende polymorphe Zellen. Teilweise ist ihre Form spindelig, zum anderen Teile rund oder unregelmäßig strahlenförmig. Die Kerne sind überwiegend rund, teilweise oval. Es finden sich mehrere unregelmäßig große Nucleolen. Die einzeln wachsenden Zellen haben eine gewisse Neigung, während der Vermehrung Membranen zu bilden (Abb. 3). Das Züchtungsmedium für diese Zellart bestand aus 80% des synthetischen Medium für Gewebekultur (TCM nach MORGAN, MORTON und PARKER 1950) und 20 Teilen menschlichen Blutserums (oder Retroplacentarserums). Die Kulturmethoden entsprechen im übrigen den für die L-Zellen beschriebenen.

Embryonale Rattenorgane wurden Keimlingen zwischen dem 17. und 19. Schwangerschaftstag entnommen. Erythrocyten der Ratte wurden durch Herzpunktion erwachsener

Abb. 4. Mechanisch isolierte Zellen der Rattenleber. (Ausstrichfärbung nach FEULGEN, Lichtgrüngegenfärbung)

Tiere gewonnen. Die Blutzellen wurden anschließend in Hanks-Lösung gewaschen. Suspensionen von isolierten Zellen der Rattenleber wurden in folgender Weise hergestellt. Nach 24stündigem Fasten wurde die Leber erwachsener Tiere unmittelbar nach der Tötung von der unteren Hohlvene her mit etwa 100 ml Hanks-Lösung durchgespült. Danach wurden die mit der Schere zerkleinerten Organe in einem sehr lockeren Glashomogenisator nach POTTER-ELVEJHEM vorsichtig zerrieben. Der entstandene Brei wurde mit einer Salzlösung stark verdünnt und mit etwa 300 g 5 min lang zentrifugiert, um etwa erhaltengebliebene Gewebestücke zu fällen. Der Überstand wurde dann mit etwa 1500 g zentrifugiert. Er ergibt einen Rückstand, der zu etwa 80% aus intakten Leberzellen besteht. Die Leberzellen liegen dabei teilweise in kleinen Komplexen von höchstens 5 Zellen vor. Die Zellmembran ist erhalten (Abb. 4). Etwa 20% des Präparates bestehen aus freien Kernen. Die Reinheit des gewünschten Präparates wird jeweils an einem Tropfen der Zellsuspension im Phasenkontrast-Mikroskop überprüft.

2. Methoden zur Gewinnung von markierten Zellbestandteilen (Fraktionierungsmethoden)

Radioaktiv markierte Zellpartikel wurden aus Zellen des MAT oder aus der Leber von Mäusen oder Ratten gewonnen. Ein Unterschied in der Aufnahme dieser Partikel in Abhängigkeit von ihrer Herkunft konnte in keinem Falle festgestellt werden.

Als Quelle für markierte Zellgranula oder definierte markierte Präparate dienten Versuchstiere, die an zwei vorhergehenden Tagen jeweils 100 μC im Falle von Ratten und 20 μC im Falle von Mäusen in Form einer wäßrigen Lösung von P^{32}-markiertem Natriumorthophosphat erhalten hatten. Am Tage vor der Gewinnung der Präparate erhielten die Tiere keine Injektionen mehr. Damit war ein ausreichender Einbau der markierten Substanz in höhermolekulare Verbindungen sichergestellt.

Die Herstellung von Kernpartikeln, Mitochondrien und Mikrosomen erfolgte in ionenfreiem Saccharosemedium. Bei Gegenwart von Ionen kommt es zur Verklumpung der Mitochondrien. Das Ursprungsgewebe wird etwa 15 min im sog. Messerhomogenisator bei voller Belastung zerkleinert. Es erscheint dann im Phasenkontrast-Mikroskop als Masse optisch homogener Granula von der Größenordnung der Mitochondrien. Danach wird das Homogenat in einer 0,88 molaren Saccharoselösung zur Gewinnung der Kerntrümmer mit etwa 8000 g für 30 min sedimentiert. Der Überstand enthält die Mitochondrienfraktion, die Mikrosomen und das lösliche Cytoplasma der Zellen. In dieser Phase der Präparation wurde die Saccharoselösung auf eine Konzentration von 0,25 m verdünnt. Aus dieser Suspension fallen die Mitochondrien bei etwa 20000 g nach längerer Sedimentierung aus. Der Überstand wurde anschließend für 60 min der vollen Drehzahl der Spinco-Ultrazentrifuge (durchschnittlich 50000 g) ausgesetzt.

Zur Gewinnung nicht näher definierter Zellgranula bewährte sich uns folgendes Verfahren: Die markierten Zellen, Leber oder Ascitestumor wurden nach der Entnahme 15 min mit dem Messerhomogenisator zerkleinert. Wesentlich ist dabei, daß man auch in ionenhaltigen Suspensionsmitteln arbeiten kann. Das ist besonders bei Versuchen über die Wirkung zugesetzter Kohlenhydrate auf die Aufnahme markierter Präparate von Bedeutung. Das Homogenat wurde anschließend bei 1000 g von etwa noch vorhandenen größeren Partikeln befreit.

Der Überstand dieser Fraktion enthält die Gesamtheit der Zellgranula und das gelöste Cytoplasma. Er wird 1 Std lang mit der vollen Drehzahl auf einer Spinco-Ultrazentrifuge geschleudert. Das Sediment enthält das aktive Phosphat zu 94% in hochmolekularer mit Trichloressigsäure fällbarer Form. Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Aktivität auf die verschiedenen Fraktionen des MAT bei Extraktion mit Trichloressigsäure. Die sedimentierten Granula werden anschließend mit einem Dispergiergerät wieder in Suspension gebracht.

Zur Herstellung reiner Präparate von Zellkernen aus Leber und Leberkerntrümmern verwendeten wir Glashomogenisatoren, in welchen die Leber 5 min bei gleichzeitiger Kühlung mit etwa 100 Umdrehungen pro Minute zerrieben wurde. Nach dieser Prozedur sind praktisch alle Leberkerne freigesetzt; ein Teil der Kerne ist zerstört. Eine Sedimentierung dieser Fraktion mit 1500 g liefert ein Präparat von unzerstörten freien Leberkernen. Leberkerntrümmer und Zellgranula bleiben bei dieser Drehzahl in Suspension. In den gewonnenen freien Kernen sind die Nucleolen noch deutlich erkenntlich (Abb. 5). Auf diese Weise gewonnene Zellkerne können gewaschen und mit Hilfe eines Messerhomogenisators in ein reines Präparat von Kerntrümmern übergeführt werden.

Tabelle 1. *Verteilung der Aktivität im MAT bei Extraktion mit Trichloressigsäure 48 Std nach Injektion von markiertem Phosphat*

Fraktion	% Aktivität nach Säureextraktion in	
	Extrakt	Rückstand
Zellfreier Ascites = Ascitesserum . .	78	22
Tumorzellen	22	78
Zellhomogenat	33	67
Ultrasediment aus Homogenat = Zellgranula	6	94

Markierte Phosphatide wurden aus MAT von Tieren gewonnen, die in der beschriebenen Weise an zwei vorhergehenden Tagen Injektionen von markiertem Phosphat erhalten hatten. Aus der getrockneten Tumorsubstanz erfolgte die Darstellung durch Acetonfällung aus dem Alkohol-Ätherextrakt (Lettré, Wrba und Seidler 1955).

P^{32}-markierte Nucleotide wurden ebenfalls aus MAT gewonnen, der vorher markiertes Phosphat aufgenommen hatte. Sie wurden in der Kälte nach vorheriger Extraktion mit

7%iger Trichloressigsäure und Alkohol-Ätherextraktion aus dem neutralisierten Rückstand durch Extraktion mit 10% Kochsalzlösung erhalten (LETTRÉ, WRBA und SEIDLER 1955).

Die Extraktion mit Trichloressigsäure zur Trennung der Zellinhaltsstoffe in hochmolekulare und niedermolekulare Verbindungen wurde durch Behandlung des Gewebes mit kalter 7%iger Trichloressigsäure erzielt.

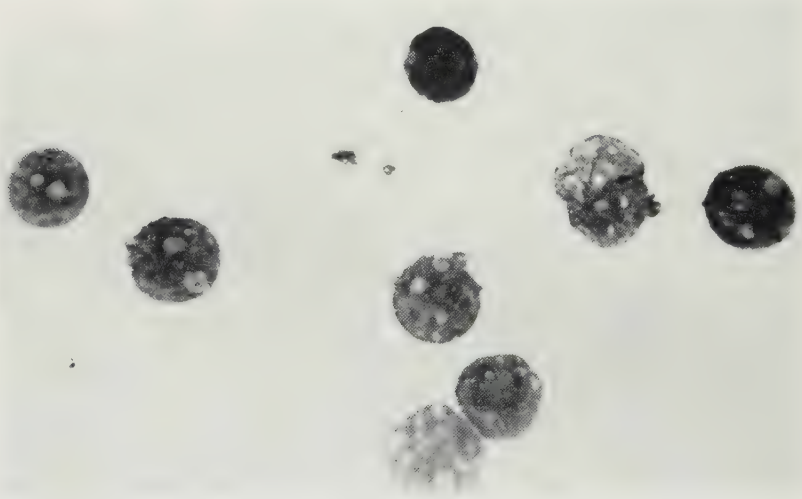


Abb. 5. Mechanisch isolierte Zellkerne aus Zellen der Rattenleber, die Nucleolen sind erhalten. (Ausstrichfärbung nach FEULGEN, Lichtgrüngegenfärbung)

3. Technik zur Herstellung von Zellsuspensionen

Versuche, bei welchen die Aufnahme von angebotener Substanz nicht länger als 5 min verfolgt werden sollte, wurden durch leichtes Schütteln eines verstöpselten Mediumröhrchens mit der entsprechenden Probe im Wasserbad bei eingestellter Temperatur durchgeführt. Längere Versuche, bei welchen die Aufnahme über Tage oder Stunden untersucht werden sollte, wurden in einem Rührsystem vorgenommen. Auch die Verbindung beider Methoden bei Untersuchungen von 1 min bis zum Verlauf von mehreren Stunden wurde geübt.

Das beschriebene Rührsystem lehnt sich an einen Vorschlag von EARLE, SCHILLING, BRYANT und EVANS (1954) an[1]. Es handelt sich dabei um einen Brutschrank, bei welchem durch die Thermometereinführung die Welle eines Rührmotors eintritt. Durch die Rührbewegung werden Zellen in Suspension gehalten. Eine Drehzahl von 10 Umdrehungen pro Minute reicht aus, um die Zellen ohne Schädigung in Suspension zu halten. Während des Betriebes kann man durch lange biegsame Kanülen aus der Suspension Proben entnehmen oder Substanzen zusetzen.

Die Zellen wurden in verschiedenen Medien aufgenommen. Zunächst verwendeten wir die Salzlösung nach PANNETT und COMPTON (1924). Es zeigte sich, daß einfacher herzustellende Lösungen ohne Schaden für die Zellen und ohne Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse in gleicher Weise geeignet waren. Bei Glucoseresorptionsversuchen diente in erster Linie glucosefreie Ringerlösung als Suspensionsmittel. In bestimmten Versuchen wurde Gey-Lösung, Hank-Lösung und Earlesche Lösung verwendet; sie alle enthalten Phosphate und Glucose in gleicher Größenordnung. In einzelnen Versuchen wurde isotonische Saccharose- oder Glucoselösung verwendet. Über besondere Suspensionsmittel wird bei der Besprechung des Versuches jeweils berichtet. Als Pufferlösung diente 0,1 m Phosphatpuffer von p_H 7,4.

[1] Die Apparatur wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. ROBERT BIERLING, Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, entwickelt; die technische Ausführung besorgte Herr VICTOR STOLL, Physiologisches Institut der Universität Heidelberg.

Die Konzentration und Verwendung zugefügter Hemmstoffe des Kohlenhydratstoffwechsels ergibt sich aus der Beschreibung der Versuche.

Für die morphologische Beurteilung wurden folgende Methoden verwendet: Ausstriche von Tumorzellen wurden üblicherweise an der Luft getrocknet und nach Feulgen gefärbt. Teilweise wurden Präparate von Tumorzellen nach Alkohol-Eisessig-Fixation mit Carmin-Orcein gefärbt. Zellkulturen wurden auf dem Deckglas direkt mit Methanol fixiert und mit Hämatoxylin gefärbt.

4. Organkulturmethode

Für unsere Zwecke hat sich eine Modifikation der sog. Roller-Röhrchen bewährt (Wrba und Kalb 1959b). Bei unserer Modifikation wird im vorderen Drittel des Röhrchens eine zylindrische Erweiterung eingefügt (Abb. 6). Nur in diesem erweiterten Abschnitt wird flüssiges Medium eingesetzt. Die Explantate werden im gleichen Querschnitt an der Innenwand eines kurzen Glasröhrchens auf einem Plasmanährboden angesetzt. Dieser Abschnitt muß so bemessen sein, daß er mit Hilfe einer Pinzette durch das Roller-Röhrchen eingeführt werden kann. In der Länge muß er den Zwischenraum zwischen den beiden, in die Erweiterung hineinragenden überstehenden Enden des Roller-Röhrchens ausfüllen. Das Röhrchen, welches die Kulturen trägt, rotiert mit der gleichen Drehzahl wie der Roller, der genau waagerecht stehen kann. Die Bespülung aller Explantate mit der gleichen Konzentration der Substanz und mit der gleichen Flüssigkeitsmenge ist damit gewährleistet. Das bei längerer Kultur notwendige Erneuern der Nährlösungen geschieht durch Übertragung des die Kulturen tragenden Rohrabschnittes in ein neues vorbereitetes Röhrchen. Der flüssige Rückstand und etwa beim Umsetzen benutzte Waschlösungen werden der chemischen Aufarbeitung zugänglich.

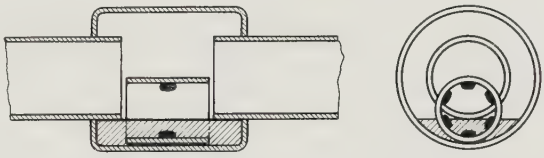


Abb. 6. Längs- und Querschnitt durch ein modifiziertes Roller-Röhrchen zur Bestimmung des Umsatzes an markierten Verbindungen durch explantierte Organe

Die markierte Substanz wird bei der Uhrglasschälchenmethode dem halbfesten Nährboden zugesetzt. Im Falle unserer Roller-Röhrchen-Methode kann die Indikatorsubstanz der flüssigen Nährlösung zugesetzt werden. Dabei ist ein besserer Kontakt zwischen Explantat und aktiver Substanz möglich.

5. Bestimmung der Aufnahme markierter Substanz und Aktivitätsmessung

a) Messung der Phosphataktivität in Zellsuspensionen. Die Bestimmung der Verteilung der in Form phosphathaltiger Verbindungen angebotenen Aktivität erfolgt beim Tumorascites praktisch auf die gleiche Weise wie bei Zellsuspensionen in vitro. Nach bestimmten Zeitabständen von der Zufuhr der Indikatorsubstanz wird eine Probemenge der Suspension entnommen. Die Zellen werden durch Zentrifugieren bei 3000 g vom zellfreien Milieu getrennt. Die sedimentierten Zellen werden anschließend nochmals in isotonischer Salzlösung resuspendiert und abermals abgeschleudert. Der Wert der Aktivität dieser Waschlösung wird zur Vermeidung von Fehlern durch Adsorption von Phosphationen an der Zellmembran dem extrazellulären Wert zugezählt. Weitere Waschungen führen dann zur Entfernung aufgenommener Substanz aus der Zelle. Das zeigt sich an einem auffälligen Anstieg der Waschlösungen.

Die Aktivitätsbestimmung P^{32}-haltiger Präparate erfolgt immer in der Weise, daß Proben von gemessenem Volumen des extrazellulären Milieus oder des Zellmaterials in genormte Tiegel abgefüllt werden (Meßprobe üblicherweise 0,5 ml). Mit gleichem Erfolg wie die Porzellantiegel verwendeten wir die ungleich billigeren Kronenkapseln (— Flaschenverschlüsse), die gestanzt sind und daher einen ausreichend gleichmäßigen Boden besitzen. Nach zweistündiger Trocknung (60°) werden die Proben bei 800° verascht, so daß nur anorganische Rückstände im Tiegel zurückbleiben. Dadurch wird die Dicke der zu messenden Schicht erheblich verringert, der Selbstabsorptionsfehler bei der Messung auf ein Minimum verringert. Die Aktivität der Proben kann im Glockenzählrohr bestimmt werden. Der ermittelte Meßwert muß jeweils auf das Gesamtvolumen der Probe umgerechnet werden.

Darstellung der Resorptionskurve: Der für das Zellmaterial ermittelte Wert wird zu einem bestimmten Zeitpunkt des Versuches in einem Koordinatensystem eingetragen. Der Abschnitt auf der Ordinate entspricht der intrazellulären Aktivität, d. h. der Abstand unterhalb der Kurve gibt die Prozente der aufgenommenen Aktivität an.

b) Messung der Phosphataufnahme an Organkulturen. Die Explantate werden nach Beendigung der Kultur üblicherweise nach 48 Std aus dem Nährboden entnommen, in 5 ml Salzlösung gespült und unter Absaugen mit 50 Tropfen der gleichen Salzlösung auf einem Filter gewaschen. Um Fehler durch unterschiedliche Größe der einzelnen Explantate auszugleichen, werden jeweils 6 Gewebsstückchen eines Ansatzes zu einer Messung in einem Tiegel vereinigt.

c) Messung von C-14-markierten Präparaten. Die Messung wird am besten am fensterlosen Zählrohr in Methanatmosphäre vorgenommen. Das zu messende Präparat wird feucht auf ein Stahlplättchen aufgetragen. Auf diesem Plättchen ist mit Hilfe eines Diamanten ein Ring zentriert und von konstanter Oberfläche aufgeritzt. Die bezeichneten und gewogenen Plättchen wurden vorher mehrere Stunden in Alkoholaceton entfettet. Das Präparat wird mit einer Glasnadel auf die ganze Oberfläche des Ringes verteilt und vorsichtig unter einer Heizlampe getrocknet. Es wird jeweils das Zellmaterial aufgetragen und anschließend durch Wägung die Menge bestimmt. Das Plättchen wird zentriert im Zähltisch eingeführt. Aus dem Gewicht des aufgetragenen Präparates läßt sich die Selbstabsorption bestimmen und eine entsprechende Korrektur beim Meßwert anbringen. Verwertet wird bei dieser Methode der Aktivitätswert des Zellrückstandes in bezug zur Gesamtaktivität der Probe.

Auch bei der Darstellung dieser Resorptionskurven entspricht der Abschnitt auf der Ordinaten dem Wert der intrazellulären Aktivität. Der höchste innerhalb eines Versuches für die intrazelluläre Aktivität ermittelte Wert wird als 100% der aufgenommenen Aktivität angenommen. Bei einem Teil der Versuche wurde Glucose-1-C^{14}, zum anderen Teil Glucose-2-C^{14} verwendet. Ein unterschiedliches Verhalten dieser beiden Präparate im Sinne unserer Fragestellung wurde dabei nicht beobachtet. Alle Präparate wurden vom Britischen Atomzentrum bezogen (Harwell). Die spezifischen Aktivitäten betrugen für D-Glucose-2-C^{14} 0,115, 12,0, 0,05 mC/mM und für Glucose-1-C^{14} 3,0 mC/mM. Auf einen Milliliter wurden jeweils 0,05 μC zugesetzt.

C. Versuchsergebnisse

1. Die Aufnahmegeschwindigkeit phosphatmarkierter Verbindungen durch Zellen des MAT in vivo

Bei der Dosierung von radioaktivem organischem Phosphat in Einzelinjektionen zwischen 0,2 μC und 1 mC hat sich ergeben, daß die optimale Einbauleistung bei geringstem Ausscheidungsverlust für eine tumortragende Maus bei 20 μC liegt. Eine Veränderung dieser Dosis nach beiden Seiten ergibt eine relative Verzögerung der Aufnahmegeschwindigkeit der Substanz innerhalb der ersten Stunden (Abb. 7). Im folgenden werden daher Einzelinjektionen pro Maus immer mit 20 μC vorgenommen.

a) Die Beziehung zwischen dem Alter der Geschwulst und der Phosphataufnahme. Erfahrungsgemäß befinden sich die Zellen einer Ascitesgeschwulst in den ersten Tagen nach der Überimpfung in einer sehr günstigen Stoffwechsellage. Diese Situation findet ihren Ausdruck in einer starken Volumenzunahme der Ascitesflüssigkeit und einem entsprechenden Gewichtsanstieg der Maus. Mit zunehmendem zeitlichem Abstand vom Augenblick der Überimpfung nimmt die Zahl der Zellen in Mitose ab. Die Zahl der untergehenden Zellen, die an regressiven Kernveränderungen, Karyolysen und Cytolysen kenntlich sind, nimmt im gleichen Maße zu. Die Verdoppelungszeit, d. h. der Zeitraum, in welchem die Zahl der Tumorzellen sich verdoppelt, wird mit zunehmendem Abstand von der Überimpfung im gleichen Zeitraum länger. Der steile Anstieg der Gewichtskurve als Ausdruck der Gewichtszunahme des Tieres durch die Vermehrung des Tumorvolumens im Zeitraum vom zweiten bis zum achten Tage nach der Überimpfung

entspricht der starken Vermehrungsaktivität der Geschwulst. In dieser logarithmischen Phase der Zellvermehrung sind die Tumorzellen erfahrungsgemäß sehr vital, die überprüfbaren Stoffwechselvorgänge besonders angeregt.

Entsprechend dieser Änderung im biologischen Verhalten waren charakteristische Unterschiede der Aufnahmebereitschaft der Zellen für anorganisches Phosphat zu erwarten. In zahlreichen Versuchen wurden Zellen des MAT in verschiedenem zeitlichem Abstand von der Impfung auf ihre Fähigkeit, die gleiche Dosis Phosphat aufzunehmen, untersucht. Während am 3. Tage nach der Implantation der Geschwulst nach 1 Std schon 90% der angebotenen Gesamtaktivität in den Tumorzellen verankert sind, nehmen 15—18 Tage alte Impftumoren im gleichen Zeitraum und bei gleicher Konzentration der markierten Substanz nur 50% der Aktivität auf. Die Übergänge von einem Tage nach der Beimpfung zum anderen sind fließend, aber schon ein Abstand von 48 Std ergibt signifikante Unterschiede. Die jeweils in einem Versuch benutzten und in verschiedenen Zeiträumen nach der Beimpfung verarbeiteten Tumoren entstammen dabei dem gleichen Impfmaterial (Abb. 8).

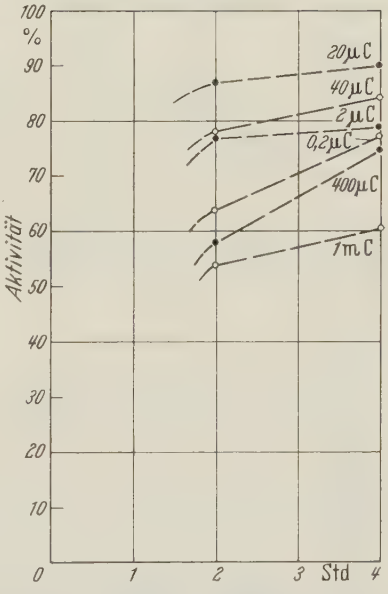


Abb. 7. Aufnahme an markiertem Phosphat durch Zellen des MAT in vivo in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz. Alle Werte wurden gleichzeitig an verschiedenen Tumor-Tieren der gleichen Passage gewonnen. (Der Abschnitt auf der Ordinate entspricht in allen Kurvendarstellungen der intracellulär aufgefundenen Aktivität)

b) Die Beziehung zwischen Verwertung und Bindungsform der zugeführten Substanz. Um die Resorptionsleistung einer Tumorzelle für angebotene Substanz als Ausdruck ihrer Syntheseleistung verwerten zu können, mußte die Spezifität der Resorption bestätigt werden. Es war notwendig, Aufschluß über Verbleib und Verwertung zugeführter Indikatorsubstanz innerhalb der Zelle zu gewinnen. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß Tumorzellen selbst hochmolekulare bis zur mikroskopischen Sichtbarkeit reichende Partikel aufnehmen können (Lettré und Wrba 1954).

Es wurden daher definierte hochmolekulare markierte Verbindungen und phosphatmarkierte Zellpartikel in der Größenordnung der Mitochondrien hergestellt. Es wurden entwickelten Ascitestumoren in der Phase der logarithmischen Zellvermehrung Präparate phosphatmarkierter Phosphatide und polymerer Nucleotide injiziert. Daneben wurden im gleichen Versuch markierte Kernpartikel, markierte Mitochondrien und gelöstes Cytoplasma markierter Tumoren zugeführt. Es zeigte sich, daß anorganische Phosphationen die schnellste Einwanderungsgeschwindigkeit in die Tumorzelle aufwiesen. Von den höher molekularen Substanzen traten die Phosphatide gegenüber Zellpartikeln Nucleotiden und markierter Ascitesflüssigkeit beschleunigt in die Zellen ein (Abb. 9). Dementsprechend sind vom anorganischen Phosphat nach 2 Std durchschnittlich 70% und nach 6 Std 85% der Aktivität intrazellulär aufzufinden. Von den Nucleotiden

finden sich nach 2 Std etwa 30% und nach 6 Std durchschnittlich 50% der Aktivität innerhalb der Zellen.

Bei der Aufschlüsselung der intrazellulären Verteilung der Aktivität nach der Resorption solcher Fraktionen auf Kern, Cytoplasma und Mitochondrien ergibt sich im Untersuchungszeitraum von 6 Std regelmäßig eine Abnahme der Aktivitätswerte im gelösten Cytoplasma und ein Anstieg der Aktivität im Kern. Das bedeutet, daß die aufgenommene Substanz über das Cytoplasma in den Kern gelangt und daß ein gewisser Teil des angebotenen Materiales im Kern eingebaut

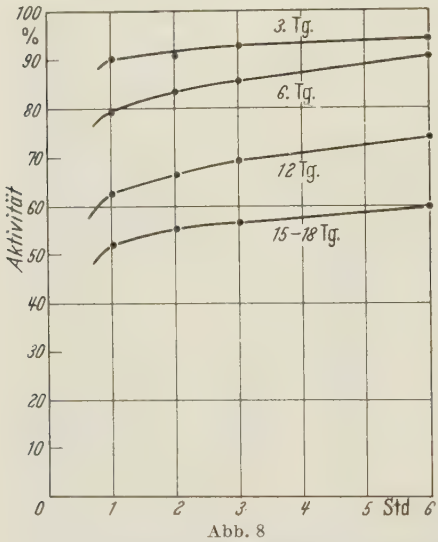


Abb. 8

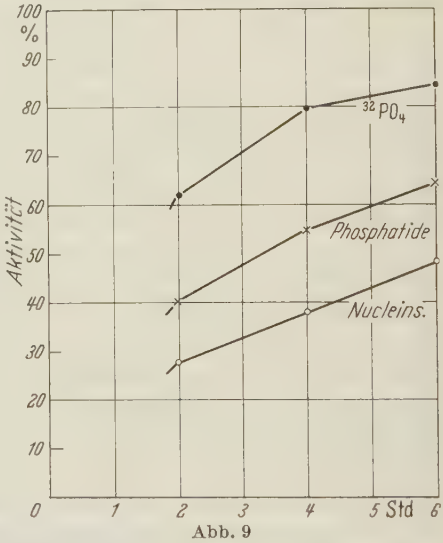


Abb. 9

Abb. 8. Aufnahme von markiertem Phosphat durch Zellen des MAT in vivo in Abhängigkeit vom Alter der Geschwulst. Alle Werte wurden an Tieren der gleichen Passage gewonnen

Abb. 9. Die Aufnahme von phosphatmarkierter Substanz in Abhängigkeit von der Bindungsform der Aktivität durch Zellen des MAT in vivo

wird. Es ergibt sich dabei, daß nach der Resorption von markierten Nucleotiden nach 2 Std schon 60% der aufgenommenen Aktivität im Kern lokalisiert sind. Dieser Kerneinbau liegt dabei noch etwas höher als der Wert für den Einbau von anorganischem Phosphat. Die in Form von Phosphatiden zugeführte Aktivität findet sich nach 2 Std erst zu 25% im Kern. Trotz der geringen Einwanderungsgeschwindigkeiten der Nucleinsäuren oder hochmolekularer Nucleotide in die Zellen kommt es demnach zu einen sehr raschen Einbau der angebotenen Nucleinsäurebausteine in den Zellkern (Abb. 10).

Die Phosphatide, welche die Zellmembran beschleunigt passieren konnten, werden dagegen zum größten Teile unverändert im Cytoplasma abgelagert. Die Werte für die Aufnahme und den Kerneinbau der verschiedenen angebotenen definierten Zellpartikel liegen zwischen den beiden genannten Extremen.

Dieser Befund berechtigt zu dem Schluß, daß die Aufnahme von Substanz nicht auf zufallsmäßiger Einwanderung beruht, sondern offenbar einen Ausdruck des Stoffbedarfes der Zelle darstellt. Ein anderer Hinweis dafür, daß die Aufnahme definierter Bausteine als Ausdruck des Stoffbedarfes und der Synthesebereitschaft der Zelle und als spezifische Funktion angesehen werden kann, findet

sich bei einer weiteren Versuchsanordnung. Durch Behandlung des Gewebes mit 7—9%iger Trichloressigsäure läßt sich die Gesamtheit der Zellinhaltsstoffe in niedermolekulare und hochmolekulare Stoffe trennen. Im löslichen Trichloressigsäureextrakt finden sich niedermolekulare, im entsprechenden Rückstand hochmolekulare Substanzen. Es bestand daher die Möglichkeit, nach der Resorption markierter Substanz in verschiedener Form die intrazelluläre Aktivität auf ihre Verteilung in Überstand und Rückstand zu untersuchen. Es zeigt sich dabei, daß 1 Std nach Angebot von phosphatmarkierten Zellpartikeln die Aktivität schon zu etwa 50% in hochmolekular eingebauter Form vorliegt. Dieser Wert bleibt während eines Versuchszeitraumes von 24 Std nahezu konstant. Dagegen findet sich nach der Aufnahme von anorganischem Phosphat ein viel geringerer Prozentsatz im Trichloressigsäurerückstand. Im weiteren Versuchszeitraum kommt es dementsprechend nach der Aufnahme der Aktivität in anorganischer Form zu einem kontinuierlichen Einbau der aktiven Substanz in hochmolekulare Ver-

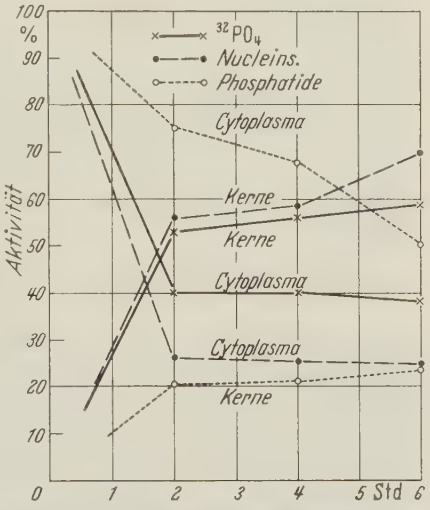


Abb. 10. Die Verteilung der aufgenommenen Aktivität innerhalb von Zellen des MAT nach ihrem Angebot in verschiedener Bindung

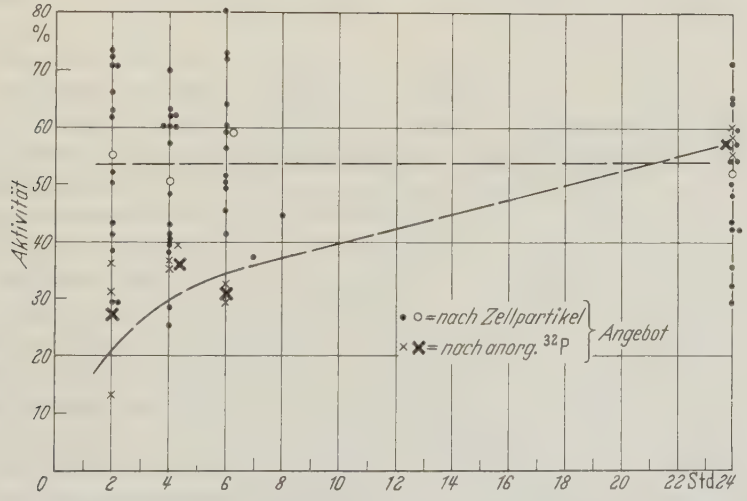


Abb. 11. Die Verteilung der in vivo durch Zellen des MAT aufgenommenen Aktivität auf hoch- und niedermolekulare Zellinhaltsstoffe nach Angebot von anorganischem und organisch gebundenem radioaktivem Phosphat. Der Abschnitt auf der Ordinate entspricht der Aktivität des Säurerückstandes. Die einzelnen Punkte stellen Ergebnisse einzelner, voneinander unabhängiger Versuche dar. Die eingezeichneten Kurven entsprechen den errechneten Mittelwerten

bindungen. 24 Std nach dem Angebot des Materials ist der Wert für die hochmolekular eingebaute Aktivität annähernd gleich (Abb. 11). Dieser Befund

liefert gleichzeitig einen sicheren Hinweis darauf, daß die Aufnahme hochmolekularer Verbindungen ohne vorherige Depolymerisation in unveränderter Form erfolgen muß.

Die komplexe Abhängigkeit von Tumorzellen in vivo, ihrer Stoffwechsellage und ihrer Vitalität von Umweltfaktoren, individuellen Variationen der Versuchstiere, vom Zeitabstand der Beimpfung mit der Geschwulst usw. ließen es wünschenswert erscheinen, zur Sicherung der Befunde ein geschlossenes System zu entwickeln. Ziel dieser Versuchsanordnung mußte es sein, den Ablauf des Experimentes so zu gestalten, daß mit Sicherheit im Versuch jeweils nur *ein* kontrollierbarer Faktor variabel wäre.

2. Die Aufnahme phosphatmarkierter Verbindungen durch Suspensionen von Tumorzellen in vitro

Unter Verwendung des beschriebenen Rührsystems wurde auf je 5 ml Ascitestumor oder Zellsuspension ein Aktivitätszusatz von je 20 μC vorgenommen. In gleicher Weise wie in vivo wurde nach festgelegten Zeitabständen die Verteilung der Aktivität auf zellfreies Medium und Tumorzellen bestimmt. Der entscheidende Vorteil dieser Versuchsanordnung liegt darin, daß Zellmaterial gleicher Herkunft auf mehrere Proben verteilt werden kann. Die Versuchsbedingungen können für alle Ansätze vollständig gleich gehalten werden.

Auch bei dieser Versuchsanordnung wurde die Aktivität des Mediums, in welchem die Zellen nach der Entnahme und Sedimentierung gewaschen worden waren, als extrazellulärer Aktivitätswert dem Wert des nativen extrazellulären Milieus hinzugezählt. Es zeigte sich, daß unter den im Rührsystem herrschenden Bedingungen eine Resorptionskurve zu gewinnen ist, die mit der in vivo gewonnenen Kurve vergleichbar ist.

Eine Züchtung von Ascitestumorzellen im Sinne einer Vermehrung der Zellen in einer Suspension in vitro ist bisher nicht gelungen. Die Aufbewahrung vitaler Zellen über längere Zeiträume ist sehr schwierig. Bei der Untersuchung von Stoffwechselleistungen in vitro zur Gewinnung einer Aussage über die Vitalität der zu untersuchenden Zellen ist es daher unerläßlich, Versuchsbedingungen zu wählen, die den physiologischen möglichst angepaßt sind. Aus diesem Grunde wurde die Untersuchung in einem System vorgenommen, das mit einem langsamen Rührwerk ausgestattet ist. Damit wird die Sedimentierung der Zellen verhindert und eine kontinuierliche Durchmischung in der Nährflüssigkeit erzielt. Diese Bewegung soll der Bewegung in vivo, die durch Peristaltik und willkürliche Muskelbewegung des Versuchstieres entsteht, möglichst ähnlich sein. Daneben ist eine ganze Reihe von physikalischen Faktoren zu beachten. Die Versuchstemperatur lag konstant bei 37.5°. Die Suspension wurde bei allen Untersuchungen durch einen Zusatz von Pufferlösung auf p_H 7.4 eingestellt. Die Wasserstoffionenkonzentration ist bei Resorptionsversuchen eine entscheidende Größe. Gourly und Matschiner (1953) haben nachgewiesen, daß bei saurer Reaktion der Materialaustritt aus der Zelle die Stoffaufnahme überwiegt. Wir verwendeten in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle Phosphatpuffer.

Für die einzelnen Versuche wurden jeweils Suspensionsmengen von 15—25 ml pro Rührgefäß gebraucht. Die notwendige Gesamtmenge wurde grundsätzlich von Tieren gewonnen, die einen Tumor des gleichen Impfdatums trugen.

Möglichst wurden dabei Krebse verwendet, die von einem Tier transplantiert worden waren. Die Mischung dieser homogenen Ascitestumormengen wurde auf entsprechend viele Ansatzgefäße verteilt. Daraus ergibt sich, daß in den verschiedenen Ansätzen eines Versuches jeweils hinsichtlich ihrer Herkunft, ihres Alters, ihrer Zellzahl und ihrer Zellkonzentration identische Proben vorlagen.

a) Die Abhängigkeit der Aufnahme phosphatmarkierter Substanz von der Phosphatkonzentration im Medium. Da die Aufnahme anorganischer Ionen in erster Linie physikalisch-chemischen Gesetzen unterliegt, muß für die Phosphataufnahme, ähnlich wie in vivo, auch in vitro eine optimale Konzentration vorhanden sein. Zu hohe Phosphatkonzentration führt dazu, daß die Aufnahmefähigkeit überschritten wird. Geringe Konzentration der zugeführten Indikatorsubstanz macht die statistische Wahrscheinlichkeit der Berührung zwischen einer Zelle und dem markierten Ion geringer. Mit der von uns gewählten Konzentration an Phosphat befinden wir uns nach beiden Seiten weit von dieser Begrenzung.

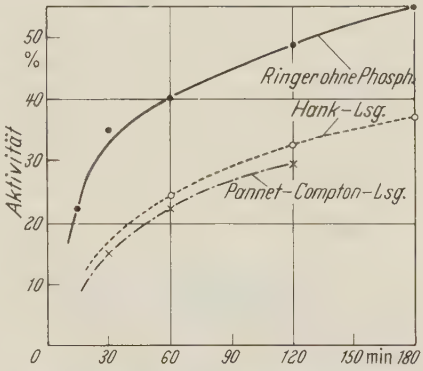


Abb. 12. Aufnahme an markiertem Phosphat durch Zellen des MAT in vitro in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration im Suspensionsmedium

Die Suspension von Ascitestumorzellen der gleichen Herkunft in Proben verschiedener Phosphatkonzentration ergibt dementsprechend verschiedene Aufnahmegeschwindigkeit. Bei Verwendung von Suspensionsmitteln unterschiedlicher Konzentration zeigt sich der gleiche Effekt. Als Beispiel haben wir 3 Proben in phosphatfreier Ringerlösung, in Pannet-Compton-Lösung und in Hanks-Lösung ausgewählt (Abb. 12). Die beiden letzten Salzlösungen enthalten Phosphorsäuresalze in gleicher Menge, die ihnen entsprechenden Kurven liegen deckungsgleich. Die phosphatfreie Ringerlösung ergibt dagegen eine relativ schnellere Einwanderungsgeschwindigkeit der markierten Phosphationen. Schon nach 30 min des Versuches liegt der Wert der intrazellulären Aktivität für Ringerlösung um mehr als das Doppelte höher.

Eine Aussage über eine Beeinflussung der Phosphatresorption und Schlußfolgerungen über den Wirkungsmechanismus etwaiger Versuchsanordnungen ergibt sich daher nur im vergleichenden Versuchsansatz, d.h. nie aus dem absoluten Wert der Substanzaufnahme, sondern aus dem Vergleich der relativen Aufnahmewerte unter der Voraussetzung gleicher Phosphatkonzentration. Diese Voraussetzung ist erfüllt, wenn in einem vergleichenden Versuch jeweils Zellen gleicher Herkunft im gleichen Suspensionsmittel aufgenommen werden.

b) Die Aufnahme markierter großer Moleküle und Partikel unter der Wirkung von Glucose. Die Fähigkeit der Zellen des MAT in vivo, große Moleküle bis zum Bereich der lichtmikroskopisch sichtbaren Zellpartikel aufzunehmen, kann als Kennzeichen dieser Zellart gelten. Aus den oben geschilderten Versuchsergebnissen über die Aufnahme markierter Partikel und aus einer Reihe von Versuchen anderer Art geht diese Fähigkeit hervor (Lettré und Wrba 1954). Die Membranpassage großer Moleküle ist mit Eiweißfaserkontraktion verbunden, somit ein

energieverbrauchender, aktiver Vorgang. Anorganische Moleküle wie das PO_4-Ion gelangen auf Grund von Diffusions- und Ionenaustauschvorgängen durch die Zellmembran. Zur Aufnahme großer Teilchen gehört demnach neben der intakten Zellmembran ein ausreichender Energievorrat in der Zelle und die erhaltene Funktion der energieliefernden Reaktionen. Von diesen Überlegungen ausgehende Versuche wurden derart angesetzt, daß in vitro suspendierte MAT-Zellen und Zellen des Walker-Carcinoms markierte Zellgranula zugesetzt erhielten. Dabei ist es gleichgültig, ob das angebotene Präparat von Tumor- oder Organzellen stammt.

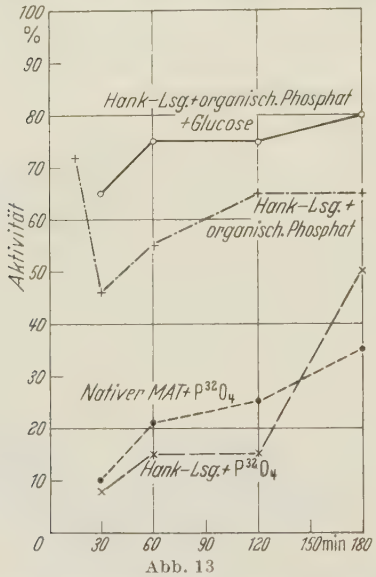


Abb. 13

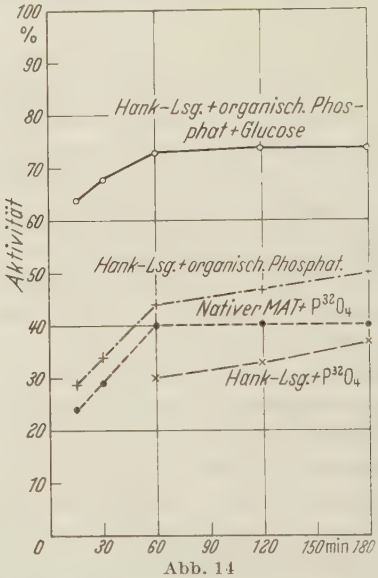


Abb. 14

Abb. 13. Die Aufnahme an Phosphat-markierter Substanz durch Zellen des MAT in vitro mit und ohne Glucosezusatz zum Suspensionsmittel

Abb. 14. Die Verteilung der Aktivität auf hoch- und niedermolekulare Substanz nach Aufnahme von anorganischem und organisch-gebundenem Phosphat^{32} durch Zellen des MAT in vitro mit und ohne Glucosezusatz. Der Abschnitt auf der Ordinate entspricht der Aktivität des Säurerückstandes

Bei der Inkubation verschiedener Proben aus der gleichen Mischung von MAT des gleichen Transplantationsdatums ergibt sich, daß die Zellen in vitro organisch gebundenes Phosphat in gleicher Größenordnung wie angebotene Phosphationen aufnehmen. Dieser Befund ist auch unter Verwendung von Zellen des soliden Walker-Carcinom zu gewinnen, welche in der beschriebenen Weise vor der Inkubation mechanisch soweit zerkleinert wurden, daß nur Komplexe von höchstens 10 Zellen in der Suspension vorliegen. In beiden Fällen liegen die Impulszahlen der resorbierten, intrazellulär verankerten Substanz vergleichbar hoch. Mit organisch gebundenem Phosphat meinen wir dabei solches, das fest in Zellgranula entsprechend den Werten der Tabelle 1 zu 94% in hochmolekularer Form eingebaut ist. Der Verlauf der Resorptionskurven ist in Abhängigkeit von Schwankungen des Zellmateriales und der unkontrollierbaren Bedingungen, etwa der vor der Entnahme im Gewebe herrschenden Phosphatkonzentrationen, im genauen Verlauf unterschiedlich. 30 Versuche dieser Art zeigen, daß organisches und anorganisch gebundenes Phosphat vergleichbar aufgenommen wird. Abb. 13

veranschaulicht das Ergebnis eines solchen Versuches. Entsprechend den in vivo gefundenen Bedingungen ist dabei die Einwanderung der Phosphationen gegenüber den hochmolekularen Präparaten beschleunigt. Bei Zusatz von Glucose in einer Probe ergeben sich überraschende Befunde. Die 3 Proben dieses Versuches enthielten Zellen des MAT in Hanks-Lösung suspendiert. In einem Falle wurde anorganisches $P^{32}O_4$, im 2. Falle organisch gebundenes Phosphat in Form von Zellpartikeln, im 3. Falle Zellpartikel mit einem Zusatz von Glucose in einer Endkonzentration von 2,0% zugesetzt. Unter den gewählten Versuchsbedingungen ergibt sich, daß die hochmolekular angebotene Aktivität bei Gegenwart von Glucose wesentlich schneller intrazellulär nachweisbar wird. Die erreichten Werte sind im vorliegenden Falle schon nach 1 Std am Höchstwert angelangt. Die Aufnahme von 70% der angebotenen Aktivität in die Zellen stellt für die Verhältnisse in vitro ein Maximum dar, das durch keinerlei andere Versuchsbedingungen erreichbar ist. Bei Verwendung von Suspensionen des soliden Walker-Carcinoms zeigt sich ein gleichsinniger Effekt, jedoch ist dabei bis zu 4 Std ein weiterer Anstieg der Aufnahme markierter hochmolekularer Substanz zu verzeichnen (Wrba 1959b). Auch dabei liegt die erreichte Größe weit über dem entsprechenden glucosefreien Ansatz. Bei Verwendung von MAT-Zellen ist das Maximum der Aufnahme bei Glucosezusatz meist schon nach 1 Std, seltener nach 2 Std erreicht.

Eine Parallele für diesen Befund findet sich in den Ergebnissen von Zamecnik und Stephenson (1950), Zamecnik (1953) und Kit und Greenberg (1951), die feststellen konnten, daß der Einbau von markierten Aminosäuren bei Gegenwart oder Zusatz von Glucose erheblich beschleunigt war.

Ähnlich ist die Frage, ob hochmolekular angebotene Substanz wie in vivo unverändert in die Zellen aufgenommen wird, oder ob sie dabei abgebaut wird, durch Extraktion mit Trichloressigsäure zu entscheiden. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse der im gleichen Versuch durchgeführten Aufschlüsselung der Verteilung der intrazellulären Aktivität auf hochmolekulare und niedermolekulare Substanz, durch Extraktion mit 7% Trichloressigsäure. Die Proben, welche hochmolekular gebundene Aktivität angeboten bekommen haben, enthalten nach 30 min zwischen 70 und 80% der aufgenommenen Aktivität in hochmolekularer, mit Trichloressigsäure fällbarer Form. Nach Angebot von $P^{32}O_4$ sind im gleichen Zeitraum nur etwa 10% der intrazellulären Aktivität hochmolekular eingebaut. Das bedeutet bei dem Fehler der Extraktionsmethode, daß praktisch nichts von der anorganischen Aktivität hochmolekular eingebaut ist. In der Folge steigt in den Proben mit anorganischem Phosphat der Säurerückstandswert kontinuierlich an. Dies entspricht einem allmählichen Einbau aufgenommener Substanz in synthetisierte höhermolekulare Zellinhaltsstoffe. Während mit Glucosezusatz suspendierte und mit organischem Phosphat versehene Tumorzellen das erreichte Maximum an säurefällbarer Aktivität innerhalb der Zellen beibehalten und weiter steigern, sinkt in den Versuchen ohne Glucosezusatz der intrazellulär vorhandene Aktivitätswert im Säurerückstand zunächst ab. Dabei ist zu bedenken, daß im Falle des Glucosezusatzes der absolute Wert der in der Zelle vorhandenen Aktivität nahezu doppelt so hoch ist. Möglicherweise wird im Falle der Resorption von markierten Zellgranula ohne Glucosezusatz die hochmolekular aufgenommene Substanz zur Energiegewinnung innerhalb der Zelle depolymerisiert.

Diese Versuche besagen mit einiger Sicherheit, daß die Aufnahme hochmolekularer Substanz oder die Phagocytose von Zellpartikeln eine energieverbrauchende Funktion darstellen. Ihr Vorhandensein oder ihr Fehlen kann eine Aussage für die Situation im Energiehaushalt liefern. Es ist dabei zur Beweisführung wichtig, daß durch Zusatz von Monojodacetat und der daraus Resultierenden damit eine Hemmung der Glykolyse der aufnahmesteigernde Effekt der Glucose unterbunden wird (Wrba 1959b).

Aus dieser Versuchsanordnung ergibt sich weiter, daß Substanz von Zellen des MAT und des Walker-Carcinoms in hochmolekularer Form unverändert aufgenommen werden kann und daß aufgenommenes anorganisches Phosphat auch in vitro (trotz des Fehlens von Mitosen und sonstiger Zeichen von Zellaktivität) kontinuierlich eingebaut wird.

3. Die Phosphataufnahme durch Organkulturen
(Unter Mitarbeit von Dr. Dr. H. W. Kalb)

Für einen Vergleich normaler Gewebe mit solchen, die von Tumoren stammen, ist die Verwendung solider Organe Voraussetzung. Bei der für die Suspension notwendigen Zerkleinerung des organisierten Gewebes kommt es durch das Trauma zu unkontrollierbaren Veränderungen. Ein Impftumor verträgt die Zerkleinerung und die damit verbundenen Prozeduren erfahrungsgemäß, ohne wesentlich von seiner Vitalität einzubüßen. Parenchymatöse Organe sind dagegen äußerst empfindlich. Um eine vergleichende Untersuchung des Umsatzes nachzuweisender Stoffe mit Verwertung verschiedener Gewebe durchführen zu können, wählten wir die Organkultur.

Es ist eine alte Erfahrung der Gewebezüchter, daß eine Organkultur im Sinne des Wortes mit Vermehrung der Zellen und Wachstum des ganzen Explantates nur bei Benutzung embryonaler Gewebe möglich ist. Es galt zunächst festzustellen, ob explantierte Organstückchen unter den Bedingungen der Kultur Phosphat aus dem Nährboden in verwertbarem Maße aufnehmen und dann zu prüfen, wieweit diese Substanzaufnahme in Beziehung zur Vitalität des Gewebes steht und spezifisch sein könnte.

a) Versuche zur Spezifität des Phosphateinbaues. Es zeigte sich zunächst, daß Phosphat, welches dem Nährboden vor der Gerinnung zugefügt worden war, in den Zellen des Explantates angereichert wurde. Schon dabei ergab sich, daß dieser Einbau markierter Substanz durchaus in Beziehung zur Stoffwechselaktivität des Organes stehen mußte und nicht zu zufälligen Größen führte.

Es ließ sich nachweisen, daß in Übereinstimmung mit der Erfahrung, daß nur embryonale Organkulturen zu echtem Wachstum fähig sind, bei diesen, gegenüber vergleichbaren erwachsenen Kulturen desselben Organes, der Phosphatumsatz erheblich höher liegt. Es erwies sich dabei gleichzeitig, daß vor dem Ansetzen kurze Zeit im Wasserbad erhitzte Organe praktisch kein Phosphat aufnehmen (Tabelle 2). Durch Zusatz von Monojodacetat in einer Konzentration von 10^{-4} molar wird nach Holzer (1956) die Glykolyse von Zellen des MAT zu 100% gehemmt. Die gleiche Konzentration bewirkt an unseren Explantaten eine starke Hemmung der Phosphataufnahme. Kulturen erwachsener Organe und vergleichbare Explantate vom soliden Walker-Carcinom zeigen eine Hemmung von rund

Tabelle 2. *Die Wirkung von Jodessigsäure und Hitzeeinwirkung auf die Phosphatverwertung von Organ- und Tumorkulturen*

Leber						Tumor (Walker-Carcinom)	
Kontrolle		denaturiert		Jodessigs. Zusatz		Kontrolle	Jodessigs. Zusatz
erw.	emb.	erw.	emb.	erw.	emb.		
162	665	0	25	53	152	209	73

60% gegenüber den Kontrollkulturen. Am embryonalen Explantat ist die Hemmung noch stärker und liegt zwischen 75 und 80% der Phosphataufnahme der entsprechenden Kultur ohne Zusatz von Monojodacetat.

Tabelle 3. *Vergleich des Phosphatumsatzes erwachsener und embryonaler Organkulturen*

	Leber		Niere		Herz	
	erwachsen	embryonal	erwachsen	embryonal	erwachsen	embryonal
Versuch 1	297	655	723	1701	824	429
Versuch 2	380	737	360	986	938	309
Versuch 3	156	504			558	221
Versuch 4	189	320			433	193

Ein weiterer Beweis dafür, daß die Phosphataufnahme als spezifischer Hinweis auf die Vitalität des Gewebes verwertbar ist, ergibt sich bei Beurteilung der vergleichenden Substanzaufnahme bei erwachsenen und adulten Kulturen des Herzmuskels. Während üblicherweise embryonale Kulturen wesentlich mehr Phosphat als Kulturen des entsprechenden erwachsenen Organes aufnehmen, ist die Sachlage beim Herzmuskel umgekehrt. Die Kulturen des erwachsenen Herzens nehmen im gleichen Zeitraum mehr als doppelt soviel an aktivem Phosphat wie embryonale Explantate auf (Tabelle 3). Dazu kommt bei der Kultivierung von Herzmuskel eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zeit von der Entnahme des Organes bis zu seinem Ansatz auf dem Nährboden und seiner Aufnahme von dem Nährboden zugesetztem $P^{32}O_4$. Bei längerer Dauer der Präparation und notwendigen Manipulationen sinkt die Phosphataufnahme erheblich, d. h. der Herzmuskel ist gegen Nährstoffmangel empfindlich. Der erwachsene Herzmuskel hat einen höheren Phosphatbedarf als der embryonale. Die Intensität der Phosphorylierungsprozesse ist beim erwachsenen Herzmuskel wahrscheinlich höher. Auch gegen die Dauer der Manipulation ist der erwachsene Herzmuskel empfindlicher. Binnen 90 min ohne Nährstoffnachschub sinkt die Aufnahme eines etwa in einer Salzlösung aufbewahrten erwachsenen Herzens um über 50%. Nach einstündiger Aufbewahrung sinkt dagegen die Fähigkeit des embryonalen Herzens, während der anschließenden Kultur aktives Phosphat aufzunehmen, nur um 15—20% gegenüber Kulturen des gleichen Herzens, die sofort nach der Entnahme auf den Nährboden gebracht worden waren. Leber und Niere zeigen eine solche Abnahme ihrer Vitalität in Abhängigkeit von der Dauer des Nährstoffmangels innerhalb mehrerer Stunden nicht. Nach diesen Befunden hängt die Substanzaufnahme von der Stoffwechsellage und der Vitalität der Explantate ab.

b) Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme an markiertem Phosphat durch Kulturen verschiedener Gewebe. Bei vergleichenden Untersuchungen wurden

grundsätzlich vom gleichen Organ jeweils Kulturen embryonaler und adulter Herkunft angesetzt. Dabei zeigte sich, daß die Aufnahme des embryonalen Organes durchgehend um mehr als 100% höher liegt als beim entsprechenden erwachsenen Organ. Nur im Falle des Herzens ist die Inkorporierung der Substanz durch das erwachsene Organ durchwegs um mehr als 100% größer als beim embryonalen. Es ergibt sich daraus der Schluß, daß der Phosphatbedarf des ausdifferenzierten Herzens höher liegt (Tabelle 3).

In der Größenordnung der absolut aufgenommenen Impulszahlen liegen dabei Kulturen des Walker-Carcinoms und der Leber gleich hoch. Die Explantate der Niere nehmen wesentlich mehr Phosphat auf und liegen in der Größenordnung auf gleicher Höhe mit denen des Herzens, wobei die Einschränkung gilt, daß dabei die Phosphataufnahme vom embryonalen und erwachsenen Organ in der Größe umgekehrt liegt.

Jede Kultur dieser Art ist durch Zusatz von Hemmstoffen in der Substanzaufnahme beeinflußbar. Die Wirkung zugesetzter Faktoren ist bei dieser Versuchsanordnung besonders deutlich zu veranschaulichen. So zeigt sich, daß der Zusatz von Placentaextrakten und von Retroplacentarserum des Menschen einen deutlich steigernden Effekt auf die Phosphataufnahme von Leberkulturen ausübt (Wrba und Kalb 1960); Extrakte der Rattenplacenta wirken auf das gleiche Objekt ähnlich. Die Untersuchung der Substanzaufnahme an Organkulturen erweist sich als eine Methode, die in strenger Abhängigkeit von der Stoffwechsellage und der Intensität der Phosphorylierungsvorgänge auch am organisierten Gewebsverband eine Aussage über seine Vitalität erlaubt. Eine weitere Möglichkeit für die Verwendung einer Substanz, die ein Kriterium für die Situation im Energiehaushalt von Zellen liefern könnte, ergibt sich bei Benutzung von markierter Glucose.

4. Aufnahme und Umsatz markierter Glucose durch Suspensionen von Tumorzellen in vitro. (Unter Mitarbeit von Dr. H. Ried und Dr. R. Kageyama)

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des Indikators wurden Zellen des MAT in einer Reihe von Versuchen im Rührwerk mit verschiedenen Impulszahlen an C^{14}-markierter Glucose inkubiert. Erprobt wurden dabei Werte von 40000—500000 Impulsen pro Minute. In diesem Bereich finden sich unter sonst gleichen Bedingungen keine Unterschiede in der Aufnahme und Verwertung der angebotenen Substanz. Es wurden daher für die im folgenden geschilderten Versuche üblicherweise unter 100000 Impulse pro Minute der Substanz auf einen Milliliter der Suspension zugesetzt.

Die Größen, die sich für die Aufnahme von Glucose und den Verbleib der aufgenommenen Aktivität ergeben, sind bei den einzelnen Versuchen nicht deckungsgleich, sondern nur dem Verlauf nach übereinstimmend. Für die Darstellung sind jeweils typische Kurven ausgewählt, welche einem Einzelversuch entstammen. Wo es sich bei den dargestellten Ergebnissen um Mittelwerte aus mehreren Versuchen handelt, ist die Zahl der Versuche, die der Darstellung zugrunde liegen, angegeben. Der direkte Vergleich zweier Kurven aus verschiedenen Versuchen ist nur mit großer Einschränkung möglich. In Abhängigkeit von der Stoffwechsellage und Nährstoffsättigung der Zellen bei der Entnahme, von der Substanzkonzentration und sonstigen unkontrollierbaren Größen sind

die Ergebnisse von Versuch zu Versuch unter gleichen kontrollierbaren Bedingungen etwas verschieden. Angestrebt und zulässig ist nur der direkte Vergleich zweier Kurven des gleichen Versuches, welche sich in nur einer gewollten Größe unterscheiden.

In phosphatfreier Ringerlösung suspendierte MAT-Zellen liefern sehr gut reproduzierbare Aufnahmekurven, die in ihrer absoluten Höhe differieren, in ihrem Verlauf jedoch weitgehend übereinstimmen. Für den in den Zellen nachweisbaren Wert der Aktivität an C^{14}-markierter Glucose liegt das Maximum immer vor Ablauf der ersten 5 min nach Zusatz des aktiven Präparates. Da es technisch nicht möglich war, das Verhalten der Zellen in kürzeren Zeiträumen mit Hilfe des Rührwerkes zu untersuchen, wurde die Suspension für kürzere Versuche (s. Methodi-

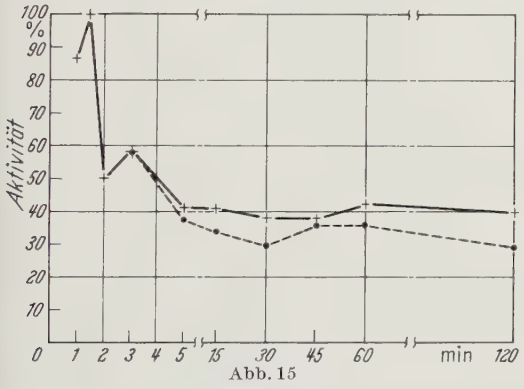


Abb. 15

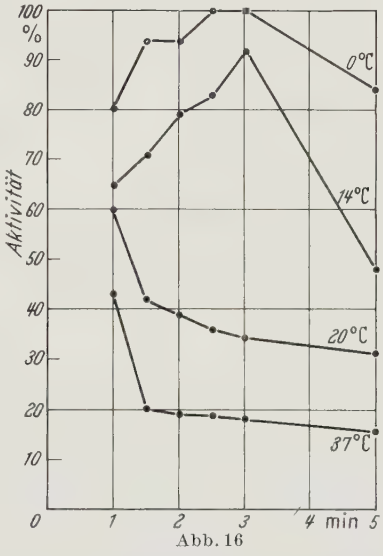


Abb. 16

Abb. 15. Aufnahme markierter Glucose durch Zellen des MAT in vitro. Der Abschnitt auf der Ordinate entspricht der innerhalb der Zellen nachweisbaren Aktivität. Bei der Darstellung der Versuchsergebnisse wurde nach Angebot markierter Glucose jeweils der höchste innerhalb des Beobachtungszeitraumes ermittelte Wert für die intracelluläre Aktivität gleich 100 % gesetzt

Abb. 16. Aufnahme markierter Glucose durch Zellen des MAT in vitro bei verschiedener Versuchstemperatur. (Mittelwerte aus 12 Versuchen)

scher Teil) in gestöpselten Glasröhrchen hergestellt. Diese Röhrchen wurden im Wasserbad von eingestellter Temperatur mit der Hand leicht geschüttelt. Vom Zusatz der Glucose bis zur Trennung von Zellmaterial und zellfreiem Milieu weniger als 1 min verstreichen zu lassen, ist technisch nicht möglich. Die Übereinstimmung der durch Schütteln von Hand gewonnenen Ergebnisse mit den Werten aus dem Rührsystem wurde mehrfach durch Untersuchungen mit beiden Verfahren bestätigt, die sich auf gleiche Zeiträume erstrecken. Abb. 15 zeigt den Verlauf eines Versuches bei 20°, wobei die beiden Methoden kombiniert wurden. Es wurden die Werte für 3 und 5 min sowohl von Hand als auch mit Verwendung des Rührwerkes bestimmt. Diese beiden Werte liegen für beide Methoden dekkungsgleich. Durch Versuche über kürzere Zeiträume läßt sich nachweisen, daß das Maximum der intrazellulär faßbaren Aktivität bei Zellen des MAT immer vor 5 min des Versuchsverlaufes erreicht ist und daß dieser Höhepunkt im Zellmaterial nachweisbarer Aktivität in seiner Lage deutlich von der Versuchstemperatur abhängt. In Proben des gleichen Ansatzes bei verschiedener Temperatur

findet sich eine Erhöhung des absoluten Wertes der im Zellmaterial verankerten Aktivität bei Senkung der Versuchstemperatur. Bei Senkung der Temperatur ist eine Verschiebung dieses Höchstwertes auf 2—4 min nach dem Zusatz der aktiven Substanz festzustellen. Abb. 16 stellt die Abhängigkeit der Glucoseaufnahme von der Versuchstemperatur dar. Die Größen geben Mittelwerte aus je 12 Versuchen für jeden Temperaturbereich wieder.

Nach 24 Std der Aufbewahrung entnommener Zellen bei 0° und anschließender Erwärmung auf die gewollte Versuchstemperatur entspricht die entstehende Resorptionskurve für die jeweilige Temperatur vollständig derjenigen, die vom gleichen Ascites unmittelbar nach der Entnahme gewonnen worden war. Dieses Ergebnis leitet über zur Bestimmung der Aufnahme im Zusammenhang mit experimentell veränderter Vitalität der verwendeten Zellen.

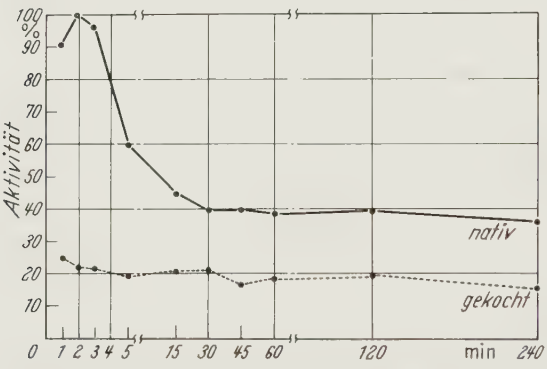


Abb. 17. Vergleich der Aufnahme von Aktivität aus markierter Glucose durch native und durch hitzedenaturierte Zellen des MAT in vitro

Es liegt nahe, die Aufnahme an markierter Glucose in Beziehung zum Energiehaushalt der Zelle zu bringen, wobei Versuchstemperatur und Zustand der Zellen entscheidende, experimenteller Änderung zugängliche Größen darstellen. Der Beweis, daß die Integrität der Zellen Voraussetzung für die Aufnahme von Glucose ist, ergibt sich auch hier aus der Prüfung des Verhaltens denaturierter Zellsuspensionen. Dazu genügt es, einen Teil der zur Verfügung stehenden Zellen 5 min im Wasserbad einer Temperatur von 100° auszusetzen. Anschließend werden die nativen ebenso wie die denaturierten Zellen bei gleicher Versuchsanordnung und 0° Versuchstemperatur über 1—20 min auf ihre Aufnahmefähigkeit untersucht (Abb. 17). Für die nativen Zellen ergibt sich die übliche Aufnahmekurve; das Maximum der intrazellulären Aktivität liegt bei 2 min. Darauf folgt der übliche Abfall der intrazellulären Aktivität. 40% der maximalen intrazellulären Aktivität bleiben dann während des gesamten Versuchszeitraumes nachweisbar. Bei den denaturierten Zellen zeigt die Aktivität über den ganzen Zeitraum 20% der maximalen Aktivität der nativen Zellen. Dieser Wert bleibt konstant und ist durch Absorption von Glucosemolekülen durch denaturiertes Eiweiß erklärbar.

Als letzte Voraussetzung war die Beziehung zwischen Aufnahme und Verwertung der Aktivität und Glucosekonzentration im Medium zu klären. Bei den von uns gewählten Aktivitäten handelt es sich immer um sehr geringe unwägbare Mengen von Glucose, die zugesetzt werden. Auch bei Präparaten geringer spezifischer Aktivität übersteigt die Konzentration an Glucose, die in Form des markierten Präparates zugesetzt wird, in keinem Falle 10 γ/ml. Für die Verwertung von Glucose gilt das für die Konzentration der Phosphorpräparate Gesagte. Mit steigender Konzentration der zugesetzten Substanz werden die Zellen bei einer

bestimmten Größe nicht mehr in der Lage sein, Glucose zu verwerten und von einem bestimmten Zeitpunkt ab wird auch die Aufnahme unmöglich sein. Die Resorptionskurve muß dann der Kurve von denaturierten Zellen entsprechen. Abb. 18 zeigt die Gegenüberstellung der Aufnahme von gleichen Mengen aktiver Glucose mit Zusätzen verschiedener Konzentrationen ani naktivem Traubenzucker. Bei einer Konzentration von 10 mg Glucose pro Milliliter Medium findet sich eine Einbaukurve, welche mit der Kurve von denaturierten Zellen (Abb. 17) übereinstimmt. Schon bei einem Zusatz von 1 mg/ml ist das Maximum

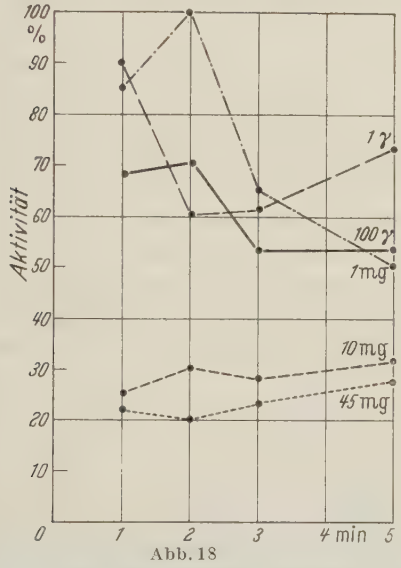


Abb. 18

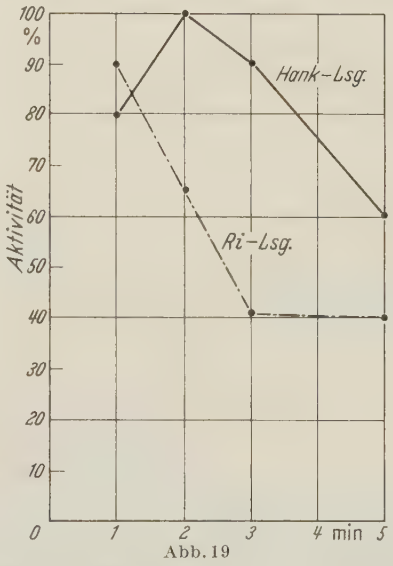


Abb. 19

Abb. 18. Aufnahme markierter Glucose mit unterschiedlichem Zusatz inaktiver Glucose durch Zellen des MAT in vitro. Die Dosis an markierter Substanz ist in allen Versuchsansätzen gleich

Abb. 19. Glucoseaufnahme durch Zellen des MAT gleicher Herkunft in glucosefreier Ringerlösung und in Hank-Lösung (= 100 mg-% Glucose). Der Zusatz an markierter Glucose ist in beiden Proben gleich

der intrazellulär auffindbaren Aktivität auf die zweite Versuchsminute verschoben und daher eine deutliche Abbauverzögerung für die markierte Glucose eingetreten.

Ähnliche Verhältnisse ergeben sich beim Vergleich der Suspension von Zellen gleicher Herkunft in glucosefreier Ringerlösung und in Hanks-Lösung. Hanks-Lösung enthält 1% Glucose. Die Aufnahme aktiver Glucose ist im glucosehaltigen Suspensionsmittel deutlich verzögert (Abb. 19).

Die mehrmalige fraktionierte Zufuhr markierter Glucose mit je 60 min Abstand über 3 Std hat nach jedem Zusatz einen Anstieg der intrazellulären Aktivitätswerte zur Folge. Die Höhe des in den Zellen nachweisbaren Gehaltes an Aktivität wird von Zusatz zu Zusatz geringer. Das Maximum der in den Zellen vorhandenen Werte findet sich dabei jeweils 1 min nach der Zufuhr der Substanz, der darauffolgende Abfall wird von einem Zusatz zum anderen flacher.

Ein Aufschluß über den Umsatz und Verbleib der in Form von C^{14}-markierter Glucose zugeführten Aktivität ergibt sich aus der Bilanz der zugeführten Gesamtaktivität während des Versuches (Abb. 20). Innerhalb der ersten Minute gehen

28% der zugeführten Aktivität bei Verwendung von Zellen des MAT in Form von $C^{14}O_2$ aus dem System verloren. Innerhalb der nächsten 4 min gehen weitere 5% der Aktivität in der gleichen Form verloren. Danach bleibt der Wert innerhalb 1 Std konstant, d. h. innerhalb der von uns gewählten Dosierung des Traubenzuckers laufen beim MAT 90% des gesamten Umsatzes der Glucose innerhalb der ersten 5 min des Versuches ab. Nur etwa 10% der in Form von Glucose zugeführten Aktivität werden in höhermolekulare Verbindungen fest eingebaut. Der Glucoseumsatz über den Citronensäurezyklus ist innerhalb von 5 min abgeschlossen. Weiterer Abfall der intrazellulären Aktivität geht nicht mehr zugunsten von $C^{14}O_2$-Bildung vor sich, sondern durch Abgabe von Milchsäure über die Glykolyse. Dementsprechend findet sich ein relativer Anstieg der Aktivitätswerte des extrazellulären Milieus auf Kosten der Werte innerhalb der suspendierten Zellen.

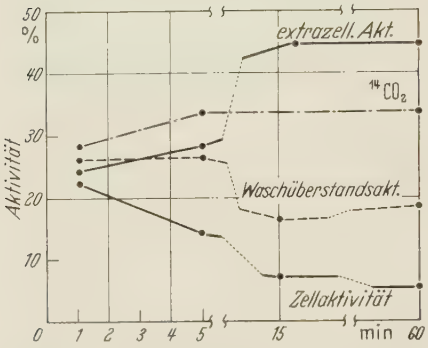


Abb. 20. Gesamtbilanz der Radioaktivität nach Zusatz von markierter Glucose zu einer Suspension von Zellen des MAT. Der Abschnitt auf der Ordinate gibt die zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelte Aktivität der jeweiligen Fraktion an

5. Umsatz markierter Glucose durch Zellen des MAT unter der Wirkung physikalischer und chemischer Faktoren

Wenn Temperatursenkung die Umsetzungsgeschwindigkeit im Kohlenhydratstoffwechsel verzögert oder blockiert, dann ist es wahrscheinlich, daß der Zusatz von Hemmstoffen des Kohlenhydratstoffwechsels ähnliche Ergebnisse liefern muß, wie die Herabsetzung der Versuchstemperatur. Asciteszellen wurden zu diesem Zweck in Ringerlösung suspendiert; eine Probe wurde regelmäßig als Kontrolle ohne Zusatz verwendet. Den Versuchsansätzen wurden bestimmte Konzentrationen von Kaliumfluorid zur Hemmung der Glycolyse oder Kaliumcyanid zur Hemmung der oxydativen Phosphorylierung zugesetzt (Abb. 21). Dabei wurde ein Teil der Ergebnisse bei 0°, der andere Teil bei Raumtemperatur (= 19°) am gleichen Ausgangsmaterial gewonnen. Beide Kontrollkurven (D und F) unterscheiden sich in üblicher Weise. Bei 19° ist nach 1 min der Höchstwert der in der Zelle verankerten Aktivität überschritten. Bei 0° ist der Abbau verzögert, die Kurve liegt entsprechend höher. Der Abbau der Glucose wird am stärksten nach gleichzeitigem Zusatz von KCN und KF bei einer Versuchstemperatur von 19° gehemmt. Das Maximum der Aufnahme ist dabei nach 5 min noch nicht erreicht. Der Abbau der aufgenommenen Substanz ist unterbunden. Die Hemmung ist in den übrigen Ansätzen abgestuft, die geringste Umsatzblockierung findet sich nach Anwendung von 0,001 n KCN bei 19°.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Vitalitätsverhältnisse in bezug auf die Glucoseaufnahme bietet sich in der Anwendung eines Stoffes mit konzentrationsabhängigen toxischen Eigenschaften. Nach PULVER, EXER und HERRMANN (1956) wird durch Butazolidin (Phenylbutazon) die Atmung von Lebermitochondrien in geeigneter niedriger Konzentration aktiviert. Bei höherer Konzentration wird an diesem Objekt die Sauerstoffaufnahme gehemmt. EXER

(1956) gibt an, daß bis zu einer Konzentration von 10 mg-% die Oxydation der Säuren des Krebszyklus gesteigert ist. Auf Grund dieser Ergebnisse haben wir diese Substanz in 2 Konzentrationen als Zusatz zu Tumorzellsuspensionen verwandt.

Wir fanden, daß 1 g-% von Butazolidin als Zusatz zu Suspensionen von MAT-Zellen eine absolute Steigerung der nachweisbaren intrazellulären Aktivität bei Zufuhr von Glucose bewirkt und daß gleichzeitig eine Verschiebung dieses Höchst-

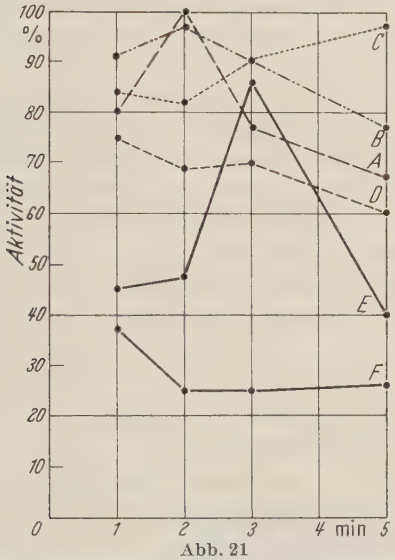


Abb. 21

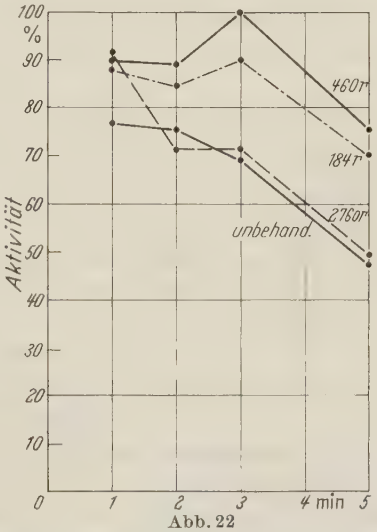


Abb. 22

Abb. 21. Aufnahme und Umsatz von Aktivität aus markierter Glucose durch Zellen des MAT in vitro unter Hemmstoffwirkung. Suspension aller Proben in Ringer-Lösung. *A* Zusatz von 0,05 m Kaliumfluorid bei 0°; *B* Zusatz von 0,05 m Kaliumfluorid und 0,001 n Kaliumcyanid bei 0°; *C* Zusatz von 0,05 m Kaliumfluorid und 0,001 n Kaliumcyanid bei 19°; *D* ohne Zusatz bei 0°; *E* Zusatz von 0,001 n Kaliumcyanid bei 19°; *F* ohne Zusatz bei 19°

Abb. 22. Die Wirkung von Röntgenbestrahlungen verschiedener Intensität auf die Glucoseverwertung durch Zellen des MAT in vitro

wertes auf 3 min eintritt. Eine Konzentration von 10 mg-% hat dagegen ein Absinken des intrazellulären Aktivitätswertes unter die Größe der Kontrolle zur Folge. Das Maximum dieser Aktivität ist dabei ebensowenig erfaßbar wie im Kontrollansatz.

Eine letzte experimentelle Möglichkeit ergibt sich aus dem Versuch, sozusagen einen Absterbegradienten oder eine kontinuierliche Vitalitätsminderung in der Zellpopulation hervorzurufen. Die direkte abstufbare Einwirkung von Röntgenstrahlen auf die entnommenen und in einer Petrischale aufbewahrten Zellen erwies sich als geeignete Methode.

Die Zellen wurden in einer Versuchsreihe verschiedenen Strahlenintensitäten ausgesetzt (Abb. 22). Die Strahlendosen von 460 und 180 r geben den erwarteten Effekt, nämlich eine Verzögerung des Glucoseabbaues, der sich in höheren Werten der intrazellulär nachweisbaren Aktivität zeigt und sich als Abweichung von der Kontrollkurve äußert. Überraschend ist jedoch der Verlauf der Umsatzkurve nach einer Bestrahlung bei einer Intensität von 2760 r. Dabei liegen die Werte in der gleichen Größenordnung wie die Ergebnisse für die Kontrolle.

Eine Erklärung für diese Erscheinung findet sich bei der Durchführung einer Aktivitätsbilanz nach der Bestrahlung. Bei der Bilanz des Verbleibes der Aktivität nach Aufnahme von Glucose durch normale Zellen (Abb. 20) stellt sich heraus, daß nach 5 min 14,5% der Gesamtaktivität intrazellulär nachweisbar werden. 53,5% der Aktivität sind zu diesem Zeitpunkt im extrazellulären Milieu (Waschüberstand + natives extrazelluläres Suspensionsmedium), 33% der Gesamtaktivität sind aus dem System veratmet. Tabelle 4 zeigt eine Gegenüberstellung der Werte einer Aktivitätsbilanz 5 min nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen. Der oxydative Abbau wird proportional der Intensität der Bestrahlung gehemmt und die größte Menge der angebotenen Aktivität liegt unverändert außerhalb der Zellen vor. Der Abfall der Kurve für die in den Zellen vorhandene Aktivität entspricht in diesem Falle wohl nicht einem Abbau, sondern einem Austritt unveränderter Glucose infolge der Schädigung der Zellmembran.

Tabelle 4. *Vergleichende Aktivitätsbilanz an Zellen des MAT 5 min nach Röntgenbestrahlung*

	Kontrolle	460 r	2760 r
Oxydativ abgebaut . .	33,0	19,5	14,5
Intrazellulär	13,5	15,0	7,5
Im Medium	53,5	65,5	78,0

6. Vergleich der Glucoseaufnahme und Verwertung durch Zellen und Gewebe verschiedener Herkunft

a) Die Aufnahme durch Zellen des Sarkom 37 in Ascitesform. Das Sarkom 37 verhält sich sehr ähnlich wie der MAT. Der Ascites enthält etwa die gleiche Zellzahl und entspricht im Ausstrich ebenfalls dem Ehrlich-Tumor. Er wächst sehr gleichmäßig ohne solide Metastasierung und im gleichen Zeitraum wie der MAT. Die Bestimmung der Glucoseverwertung der Asciteszellen des Sarkom 37 ergibt in Übereinstimmung mit der des MAT innerhalb der üblichen Versuchszeiträume einen starken Abfall der intrazellulären Aktivität. Auch dabei ist der Höchstwert dieser Aktivität vor 1 min zu suchen. Bei der Arbeit im Rührsystem bei 37° ist der Höhepunkt der in den Zellen verankerten, aus Glucose stammenden Aktivität, nicht faßbar. Auffälligerweise nimmt bei dieser Geschwulst der Aktivitätswert in den

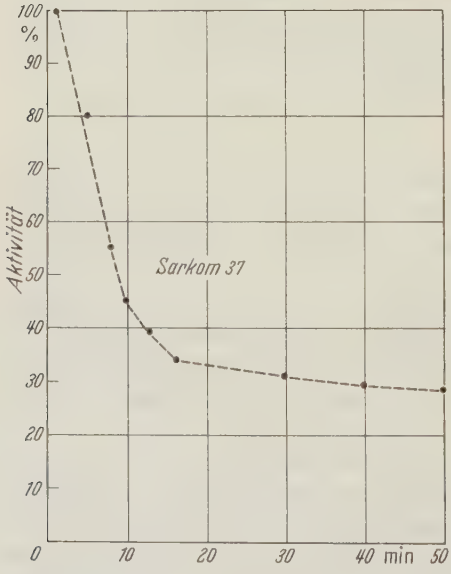


Abb. 23. Aufnahme markierter Glucose durch Zellen des Mäusesarkom 37 in vitro. Der Abschnitt auf der Ordinate gibt die Größe der intracellulären Aktivität an

Zellen bis zu 20 min ab. Abb. 23 bezieht sich auf den Verlauf eines solchen Resorptionsversuches in Ringerlösung suspendierter Zellen des Sarkoms 37 bei

20°. Bemerkenswert ist, daß die absoluten Impulszahlen bei gleichen Verhältnissen innerhalb der Zellen in der gleichen Größenordnung liegen wie beim MAT.

b) Zur Glucoseaufnahme durch Zellen des Yoshida-Sarkom und des Walker-Carcinom in vitro. Die Zellen dieser beiden Geschwülste in Ascitesform verhalten sich hinsichtlich der Aufnahme von markierter Glucose in vitro gleichartig. Im Gegensatz zu den Verhältnissen in Suspensionen von Zellen des MAT findet sich hier ein kontinuierlicher Anstieg der intrazellulär nachweisbaren Aktivitätswerte.

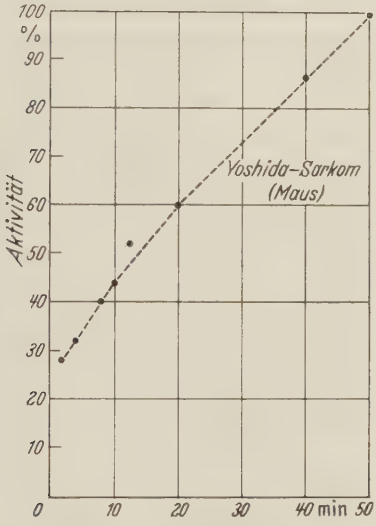


Abb. 24

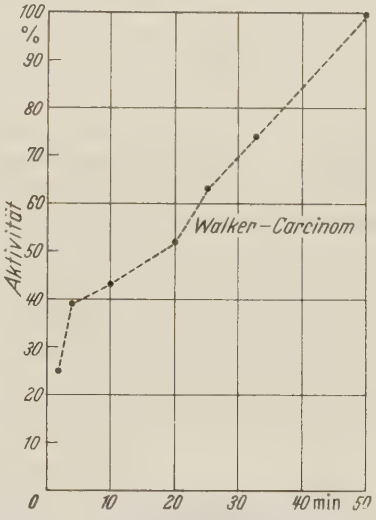


Abb. 25

Abb. 24. Aufnahme von markierter Glucose durch Zellen des Yoshida-Sarkom in Ascitesform in vitro. Der in diesem Versuch verwendete Tumor stammte von der Maus. Von der Ratte gewonnener Tumor liefert analoge Ergebnisse. Der Abschnitt auf der Ordinate entspricht der intracellulär aufgefundenen Aktivität

Abb. 25. Aufnahme von markierter Glucose durch Zellen des Walker-Carcinom in Ascitesform (Stamm MR—RM) in vitro. Der verwendete Tumor stammt von der Ratte. Der Abschnitt auf der Ordinate entspricht der intracellulär aufgefundenen Aktivität

Der höchste Punkt der aufgenommenen Aktivität ist dabei nach 1 Std noch nicht erreicht (Abb. 24 u. 25). Diese Geschwülste enthalten im Kubikmillimeter Zellzahlen, die nur ein Fünftel der entsprechenden Zahl des MAT erreichen. Die Zellsuspensionen wurden daher zellärmer angesetzt. Es befinden sich in der Versuchssuspension dabei jeweils 10000 Zellen im Kubikmillimeter. Eine entsprechende Verdünnung der Zellzahl beim MAT, welche zum Vergleich mit diesen Befunden mehrfach vorgenommen wurde, hat jedoch keinen Einfluß auf den Verlauf der Umsetzungskurven der Zellen des MAT. Aus diesen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß die Zellen dieser Geschwulst wesentlich stärker mit Glucose abgesättigt sind und daß daher eine kontinuierliche Aufnahme der angebotenen Glucose ohne die beim MAT bekannte Umsetzung erfolgt.

c) Die Aufnahme durch Zellen von Suspensionskulturen. Die Wirkung der bei der Herstellung von freien Suspensionen dieser Zellen notwendigen Behandlung mit 5% Trypsin-Lösung auf die Glucoseaufnahme mußte an Ascitestumorzellen untersucht werden. Die Inkubation von Ascitestumorzellen in einer Lösung von

Trypsin bei einer Temperatur von 14° führt nicht zu einer Änderung der Aufnahmekurve. Die Inkorporation von Glucose durch Zellen des MAT nach dieser Behandlung entspricht der normalen Kurve bei dieser Temperatur (Abb. 16). Abb. 26 zeigt den Verlauf der Glucoseaufnahme der trypsinierten Asciteszellen. Auffällig ist die Verlaufskurve für die Aufnahme der Glucose durch die im gleichen Versuch untersuchten ebenfalls trypsinierten L-Zellen. Diese Zellart zeigt nach Zufuhr von Glucose von der ersten Minute des Versuches ab eine steigende Tendenz für die Größe der in den Zellen vorhandenen Aktivität. Die Aufnahme ist

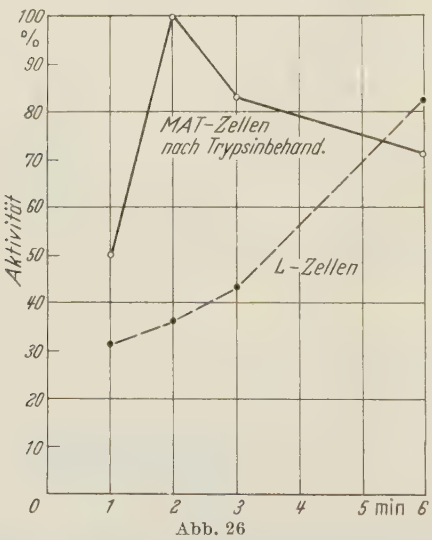


Abb. 26

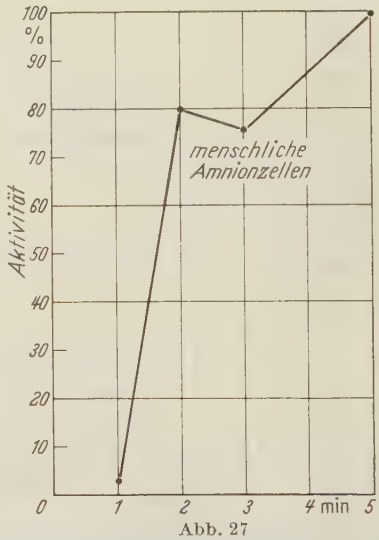


Abb. 27

Abb. 26. Vergleich der Glucoseaufnahme durch Zellen des MAT in vitro nach Trypsinbehandlung und von Zellen des Stammes L aus Suspensionskultur nach Trypsinbehandlung

Abb. 27. Aufnahme von markierter Glucose durch menschliche Amnionzellen des Stammes A 4 aus Suspensionskultur

nach 5 min offenbar noch nicht beendet. Analog findet sich für die Amnionzellen des Stammes A 4 ein mit dem der L-Zellen übereinstimmender Verlauf der Resorptionskurven (Abb. 27). In späteren Zeiträumen ist die Aufnahme von markierter Glucose durch Zellen aus Suspensionskulturen uneinheitlicher als bei Verwendung von Ascitestumorzellen. Während manchmal von 5 min ab die intrazellulären Aktivitätswerte konstant bleiben, steigt dieser Wert in manchen Fällen von diesem Zeitpunkt ab bis zu einer Stunde noch kontinuierlich um 60% an. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Wachstumsphase, in welcher sich die Zellen befinden und diesem Verhalten, läßt sich nicht bestätigen.

Die Größenordnung der Aktivitätsaufnahme aus Glucose durch diese Zellen entspricht den Impulszahlen bei der Resorption von Glucose durch Zellen von Ascitestumoren.

d) Bemerkungen zur Aufnahme markierter Glucose durch suspendierte Rattenleber und durch Erythrocyten der Ratte. Durch die Zerkleinerung solider Organe werden in ihrem Ausmaß unkontrollierbare Schädigungen der zu suspendierenden Zellen gesetzt. Für die Auswertung von an diesem Material gewonnenen Befunden

fehlt ein sicheres Bezugssystem. Solide Impftumoren vertragen die Zerkleinerung wesentlich besser und sind daher bezüglich ihrer Resorptionsleistung mit zerkleinerten Organen nicht vergleichbar.

Isolierte Zellen der Rattenleber nehmen Glucose innerhalb der ersten 5 min nach dem Zusatz ansteigend auf. Die entstehende Kurve ist mit den Kurven von Zellen aus Suspensionskulturen vergleichbar. Die dabei für die Leberzellen auftretenden Werte liegen 6—8mal niedriger als bei Zellen, die bei der Isolierung keinerlei Trauma erlitten. Durch vermehrte Zerstörung (z. B. Homogenisation) läßt sich die Fähigkeit von Leberzellen, angebotene Glucose umzusetzen, weiter senken. Der Suspensionsmethode ist für solide Organe zur Umsatzbestimmung markierter Verbindungen zweifellos die Arbeit am explantierten Gewebsverband vorzuziehen.

Die Untersuchung der Aufnahmefähigkeit von Erythrocyten war deshalb von Bedeutung, weil ihre Beimengung in Ascitestumoren als Störungsquelle auftreten könnte. Es ergab sich, daß eine signifikante Resorptionskurve von Erythrocyten der Ratte für markierte Glucose nicht zu bestimmen ist. Die Versuchstemperatur hat keinen entscheidenden Einfluß auf die Größe der Aktivitätsaufnahme. Der aufgenommene Wert bleibt über 5 min praktisch in gleicher Höhe. Die Impulszahlen innerhalb der roten Blutkörperchen sind um eine Zehnerpotenz niedriger als bei Verwendung von Ascitestumoren. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch gelegentliche Beimengungen von Erythrocyten zu Tumorzellsuspensionen ist demnach bei unserer Versuchsanordnung nicht zu befürchten.

D. Besprechung der Ergebnisse

Die Gesamtheit der vorgelegten Ergebnisse mag zunächst sehr heterogen erscheinen. Sie läßt sich unter dem Gesichtspunkt der Stoffwechselstörung als erste Wirkung bei der Vitalitätsminderung einordnen. Weit vor der morphologisch faßbaren Alteration liegt die erste Störung in der Biochemie der Zelle. Wie die im Zuge der Entwicklung auftretende Differenzierung an der Zelle biochemisch nachweisbar wird, bevor eine morphologische Änderung eintritt (Ten Cate 1954), wie die später sichtbar werdenden Veränderungen von Tochterzellen in der Ausfangszelle längst chemisch determiniert sind, so liegt die erste Störung der Zelltätigkeit an einer Stelle, die nur durch Erprobung des Zellchemismus veranschaulicht werden kann. Wenn die Mangelkrankheit sichtbar wird, der Strahlenschaden, die Infektionsfolge sich manifestiert, ist der primäre Zellstoffwechselschaden längst von einem Zusammenbruch des normalen Stoffwechsels und von einer völligen Entkoppelung der Fermentkoordination und einer Entgleisung der Regulationsvorgänge überdeckt und unauffindbar geworden. Diese Sachlage erschwert die kausale Forschung in der pathologischen Anatomie.

Alle Versuche, die Integrität der Zelle und die Störung ihrer Vitalität zu erfassen, scheitern daran, daß sich diese Begriffe von einem Objekt zum anderen anders darstellen. Schon Zellen des gleichen Organs oder Tumor geben bei feiner Untersuchungstechnik individuelle Reaktionen. Es ist selbstverständlich, daß nur unter der Voraussetzung völlig gleicher Umweltfaktoren physikalischer und chemischer Art und bei völliger biologischer Übereinstimmung Vergleiche angestellt werden können. Es ergab sich für den am Heidelberger Institut für experimentelle Krebsforschung hinsichtlich seiner Reaktionsweise sehr genau studierten

MAT die Möglichkeit, eine Frage am gleichen Tumormaterial zum gleichen Zeitpunkt mit gleichen Bedingungen in einem großen Versuch zu klären oder durch eine Vielzahl von Einzelversuchen eine statistische Sicherung der erzielten Befunde zu erreichen.

Untersuchungen von Lettré, Hemprich und Spirig (1952) ergaben, daß hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit, der Zellverdoppelung und Angangs- und Überlebenszeit zahlreiche Größen modifizierend wirken. Im einzelnen spielen Jahreszeit, Temperatur, Trägertier, Geschlecht, Konstitution und Ernährungslage eine Rolle. Wesentlich sind weiter Tumorlinie und das wechselnde Verhältnis der Entwicklung von Geschwulstzellen und zellfreiem Ascites. Bezeichnend für diese Sachlage ist, daß das Ehrlichsche Mäuseascitescarcinom, soweit es in Europa gehalten wird, das Maximum seiner streuenden Chromosomenzahl bei haploiden (Bayreuther 1952), der gleiche Stamm ursprünglich derselben Herkunft in den Vereinigten Staaten vorwiegend bei diploiden Chromosomenzahlen Maxima aufweist (Hauschka und Levan 1951).

Für die Resorption einer Substanz zeigt der Tumor eine optimale Konzentration, bei welcher er relativ am meisten aufnimmt. Diese Konzentration ist z. B. für anorganisches Phosphat leicht festzustellen (Abb. 7). Die Frage, wieviel er unter physiologischen Bedingungen aufnimmt, wieviel er als Minimum aufnehmen muß und wieviel er aufnehmen kann, ist durch verschiedene Dosierungen geklärt. Die günstigste Dosis für die Markierung von MAT mit radioaktivem Phosphat liegt nach unseren Erfahrungen bei 20 μC pro tumortragendem Tier.

Auf der Grundlage dieser Erfahrung schien es uns erlaubt, diese Dosis für Tiere verschiedenen Impfalters als Maßstab für die Größe der Aktivität, die in die Zellen aufgenommen wurde, anzuwenden. Einschränkend muß man sagen, daß Tiere mit einem Tumor geringeren zeitlichen Abstandes von der Impfung kleinere Ascitesmengen entwickeln. Am 3. Tage der Tumorentwicklung war nur nach Spülung der Bauchhöhle mit Ringerlösung Zellmaterial zu gewinnen. Für diese Tiere gilt daher, daß bei der Injektion eine größere Konzentration der aktiven Substanz pro Zelle geherrscht haben muß. Die Untersuchungsergebnisse über die Wirkung einer Steigerung der angebotenen Phosphatkonzentration ergeben, daß schon eine Verdoppelung der Dosis auf 40 μC eine merkliche Senkung der Aufnahme zur Folge hat. Das Ergebnis der stärkeren Phosphataufnahme durch jüngere Tumoren wird dadurch noch verstärkt.

Tumorzellen des MAT befinden sich offenbar am 7.—9. Tag ihrer Entwicklung in optimalen Mediumverhältnissen. Ihre Gewinnung ist leicht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Zahl der Zellteilungen höher als bei älteren Tumoren. Die Überimpfung von MAT-Mengen in dieser Wachstumsphase gibt eine besonders rasche und sichere Entwicklung von Geschwülsten. Die Verdoppelungszeit, d. h. die Zeit, in welcher jede Tumorzelle sich theoretisch einmal teilt und demgemäß die Zahl der Tumorzellen verdoppelt wird, wird mit steigendem Abstand von der Überimpfung länger (Lettré 1941, Schleich und Wrba 1953). Mit der Verlängerung des zeitlichen Abstandes von der Beimpfung des Tieres nimmt die Zahl der zugrundegehenden Zellen im MAT zu. Wahrscheinlich wird die Ernährungslage der Zellen durch den im Leib des Tieres ansteigenden Druck verschlechtert. Das Peritoneum von Tieren mit starker Ascitesentwicklung ist stark gespannt. Die Resorption von Stoffwechselendprodukten der Zellen aus dem

extrazellulären Medium ist gehemmt. In der Endphase der Tumorentwicklung sterben die Tiere meist unter vorherigem Gewichtsverlust zwischen dem 14. und 18. Tag nach der Beimpfung. Alle biologischen und cytologischen Erfahrungen am MAT stimmen demnach mit unserem Ergebnis, daß mit steigendem Impfalter die Vitalität abnimmt, überein.

Um die Gültigkeit der Untersuchung über Aufnahme von Phosphat als Hinweis für die Vitalität suspendierter Tumorzellen zu demonstrieren, muß man nachweisen, daß nicht nur Diffusionsvorgänge und Ionengehalt des Medium für die Phosphatresorption maßgeblich sind. Daß aufgenommenes Phosphat nicht zufällig ins Cytoplasma gelangt und dort etwa liegen bleibt, sondern im gleichen Maße aufgenommen wird, wie es in der Zelle organisch gebunden wird, ergibt sich aus dem auffallend schnellen Einbau der markierten organischen Substanz in den Zellkern der wachsenden Zelle (Abb. 10). Die Säureextraktion zur Identifizierung der hochmolekular angebotenen und eingebauten Aktivität liefert einen weiteren Hinweis dafür, daß aufgenommene Substanz in der Zelle sinnvoll verwertet wird. Die Spezifität, mit welcher Substanzen von der Zelle aufgenommen werden, zeigt sich in den Versuchen über die verschiedenartige Verwertung der angebotenen aktiven Substanz in Beziehung zu ihrer Bindungsform. Nucleotide, die die Zellmembran nur sehr langsam und im geringen Maße passieren, finden sich sehr schnell im Zellkern wieder. Markierte Phosphatide, die sehr rasch durch die Zellmembran treten, bleiben zum größten Teil im Cytoplasma liegen.

Um die Richtigkeit der Aussage unabhängig von den erörterten Fehlerquellen zu beweisen und um die Möglichkeit zu haben, *identische* Substrate verschiedenen Wirkungen auszusetzen, wurde das geschlossene System entwickelt, das als Rührsystem beschrieben ist. Entsprechend den in vivo gewonnenen Erfahrungen wurden dabei Konzentrationen gewählt, die mit den Verhältnissen am Versuchstier übereinstimmen. Auf 5 ml Suspension einer Menge, die der durchschnittlichen Ascitesbildung bei der Maus entspricht, wurden 20 μC Aktivität zugesetzt. Bekanntlich ist eine Vermehrung von Asciteszellen in vitro nicht möglich. Es herrscht offenbar eine Abhängigkeit von einem äußerst labilen, dem Wirtsorganismus entstammenden Faktor (Lettré und Schleich 1954). Für das Wachstum des Yoshida-Tumors in Gewebekultur ist eine Abhängigkeit der malignen Zellen von normalen Rattenzellen nachweisbar. Die maligne Zelle ist in vitro nicht lebensfähig, wenn nicht normale Rattenfibroblasten gleichzeitig vorhanden sind. Aufs Tier gebracht führen isolierte maligne Zellen rasch zur Entwicklung umfangreicher Ascitestumoren. Diese Sachlage ist offenbar ein sinnfälliger Ausdruck der von Warburg (1926) angenommenen Abhängigkeit der Tumorzelle von Fermenten des Trägerorganismus. Obwohl also MAT-Zellen in vitro nach kurzer Zeit keine Mitosen mehr aufweisen, läßt sich eine beachtliche Aufnahme von markierter Substanz sichern. Diese Zellen sind vital. Ihre Transplantation führt auch nach Aufbewahrung unter ungünstigen Bedingungen, z. B. unter Sauerstoffabschluß, noch nach zweitägiger Inkubation zur Entwicklung von Geschwülsten (Wrba 1953). Die Ascitesform der gleichen Tumorart ist sogar unter diesen Bedingungen resistenter als die entsprechende solide Geschwulst (Hart und Wrba 1954).

Die Schwierigkeit der Abgrenzung von gutartigem und malignem Gewebe besteht auch in der experimentellen Geschwulstforschung unverändert. Obwohl

„nach den einleitenden Definitionen des Geschwulstbegriffes in den verschiedenen Hand- und Lehrbüchern nichts eindeutiger bestimmbar zu sein scheint, als das, was wir unter einem Tumor zu verstehen haben", gibt es kein morphologisches und cytologisches Kennzeichen für die Eigengesetzlichkeit, welche das wesentliche Charakteristikum eines Tumor ausmacht (Büngeler 1952). Diese Schwierigkeit begegnet uns auch bei der vorliegenden Fragestellung. Auch bei Beurteilung des Stoffwechsels und bei Versuchen am lebenden Gewebe gibt es kein sicheres Kennzeichen für Malignität. Die hohe aerobe Glykolyse ist nicht nur auf Krebsgewebe beschränkt und verliert damit die Sicherheit ihrer Aussagekraft. Entscheidend für den Begriff der Malignität ist das biologische Verhalten (Büngeler 1952). Die Eigengesetzlichkeit kommt am deutlichsten in der Metastasenbildung zum Ausdruck.

Es gibt keine Methode, um an einem als Versuchsobjekt dienenden Gewebe mit Sicherheit zu bestimmen, ob es maligne entartet ist oder nicht. Sanford, Likely und Earle (1954) finden bei Rücktransplantation von 385 Kulturen aus 8 Linien von Kulturen in 27 Fällen die Entstehung von transplantierbaren Sarkomen. Bei den Kulturen handelt es sich um Mäusefibroblasten aus Passagen, bei welchen nur eine Zelle überimpft wurde. Diese Zellen wurden nach einer Kulturdauer von mehreren Monaten auf den Mäusestamm zurückverimpft, dem sie entstammten. Andere Autoren haben inzwischen bestätigende Befunde geliefert. Was unter komplizierten und langwierigen Versuchen an vielen Stellen nicht gelang — die Cancerisierung in vitro — bildete sich hier in einigen von zahlreichen unter gleichartigen Bedingungen gehaltenen Kulturen spontan und unbemerkt aus. Die spontane Entartung ist nur zu bestätigen, wenn im großen Maßstabe Rückverimpfungen des Materiales vorgenommen werden können. Durch diese Befunde wurde eine Reihe von Theorien zur Krebsentstehung erheblich in ihrer Wahrscheinlichkeit eingeschränkt.

Es fehlt nicht an Versuchen, durch Vitalfarbstoffe und ihre Anreicherung in Zellen zu einer Aussage über ihre Vitalität zu gelangen. Schrek (1936) versucht, die abgestorbenen Zellen durch Eosinanreicherung im Zelleib zu identifizieren. Methylenblau findet er weniger geeignet. Durch die Giftwirkung zugesetzter Stoffe und durch Erhöhung der Versuchstemperatur erzielt er eine Anfärbung aller Zellen. Kaltenbach, Kaltenbach und Lyons (1958) verwenden mit gleichem Erfolg Nigrosin. Diese Methoden geben wohl in erster Linie einen Überblick über die Intaktheit der Membran, ihre Resultate sind von der Wasserstoffionenkonzentration außerordentlich abhängig. Zellen des MAT, die nach Behandlung ihre Fähigkeit bei der Transplantation, Tumoren zu bilden, verloren haben, zeigen keine Trypanblauspeicherung (Thumm 1954). Tumorzellen, die sich in der Vitalfärbung noch wie lebende Zellen verhalten, haben ihre Malignität verloren. Eaton, Scala und Jewell (1959) kommen auf Grund systematischer Untersuchungen über die Schädigung der Zellen durch verschiedene Agentien zu dem Ergebnis, daß die Zellen nach Erlöschen der Fähigkeit zur Tumorbildung noch Sauerstoff aufnehmen und sich vitalfärberisch wie lebende Zellen verhalten.

Gewebe können also in vitro ohne faßbare Änderung maligne entarten und es besteht die Möglichkeit, daß lebende Zellen ihre Fähigkeit zur Tumorbildung verlieren. Die Alternative: vitale oder maligne Zelle ist offenbar auch durch Stoffwechseluntersuchungen nicht zu entscheiden. Es bleibt zur schlüssigen Fest-

stellung erhaltener Malignität (= Virulenz) nur der Tierversuch und der Nachweis des Geschwulstwachstums (Lettré und Ried 1957). Auch Versuche über Aufnahme und Umsatz von Substanzen werden demgemäß keine entscheidende Antwort auf die Frage vorliegender Malignität ergeben, sondern nur eine Aussage darüber liefern können, ob ein Gewebe lebt oder nicht. Eine diagnostische Hilfe für die Erkennung maligner Gewebe im Bereich der Klinik der Geschwulstkrankheiten ist von Untersuchungen dieser Art nicht zu erwarten.

Schon die Verwertung anorganischen Phosphates ist jedoch eine spezifische Stoffwechselleistung. Das ergibt sich nicht nur aus ihrer Hemmbarkeit und ihrer Abhängigkeit von der Stoffwechsellage und von Umweltbedingungen. Die von uns bestimmte Altersabhängigkeit der Phosphatverwertung wird durch Beobachtungen von Miroff und Cornatzer (1958) bestätigt. Die Autoren finden eine lineare Beziehung zwischen dem Alter von Zellen des CH_3-Mäuseascites und ihrer Fähigkeit, angebotenes radioaktives Phosphat einzubauen. Daneben finden sie in Fortführung der Methode von Schleich und Wrba (1953) eine direkte Beziehung zwischen der Höhe der Zellteilungsrate und der spezifischen Aktivität der Nucleinsäuren. Die Beziehung zwischen Phosphateinbau und Nucleinsäuresynthese wurde schon 1943 von Hevesy und Ottesen dazu benutzt, den Umsatz von Nucleinsäuren am lebenden Organismus aus der Geschwindigkeit zu ermitteln, mit der Radiophosphor eingebaut wurde. Miroff und Cornatzer (1958) konnten diese Altersabhängigkeit des Phosphateinbaues auch in vitro an Suspensionen von Zellen der gleichen Art bestätigen. Der Zusatz von zellfreiem Ascitesserum älterer Tumoren erwies sich als hemmend, wenn jüngere Zellen suspendiert waren. Damit bestätigt sich unsere Annahme, daß sich im Zuge der Entwicklung des Ascites Stoffwechselendprodukte und giftig wirkende Hemmstoffe im Ascitesserum anreichern.

Ein entscheidender Faktor für die Höhe der Stoffaufnahme in vitro ist auch die Konzentration der jeweils verwendeten Substanz; man findet dabei die gleiche Beziehung wie am lebenden Tier. Der Anstieg der Phosphatkonzentration infolge des Gehalts an inaktivem Phosphat im Medium verringert die Aufnahme von markiertem Phosphat von einer kritischen Größe ab. Eine von Phosphationen freie Suspensionslösung führt dementsprechend zu stärkerer Aufnahme. Der Vergleich der Phosphatinkorporation durch 2 Proben verschiedener Herkunft oder die Festlegung der Phosphataufnahme im Sinne einer Standardisierung hat als Voraussetzung gleichen Phosphatgehalt in den zu vergleichenden Proben. In Anbetracht dieser Sachlage ist eine Standardkurve für die Aufnahme einer definierten Substanz durch eine bestimmte Zellart nur unter genauer Beachtung der Konzentrationsverhältnisse konstruierbar. Somit ergibt sich die Notwendigkeit, für verschiedene Konzentrationen der kritischen Substanz in den verwendeten Suspensionslösungen oder in den nativen Medien verschiedene Resorptionskurven festzulegen. Die Sicherung derartiger vergleichbarer Ergebnisse würde es erlauben, eine beliebige Probe einer bestimmten Zellart durch Zusatz von Indikatorsubstanz aus ein oder zwei Aufnahmewerten in ihrer Aufnahmeleistung zu definieren. Der Vergleich mit einer „Normalkurve" würde eine Art Vitalitätsprobe ergeben.

Eine weitere Aussage über die Integrität der Zellfunktion ergibt sich aus der Beurteilung der Fähigkeit einer Zellart, angebotene höhermolekulare Substanz aufzunehmen. In der Gewebekultur können Zellen ganz unterschiedlicher

Herkunft mikroskopisch sichtbare Tropfen aufnehmen. Diese Pinocytose scheint eine allgemeine Funktion lebender Zellen zu sein (Lewis 1931). Die Zellen des MAT sind befähigt, große Partikel aufzunehmen (Lettré und Wrba 1954). Ferner ist es möglich, durch Injektion von isolierten Bestandteilen von Zellen des MAT eine Zunahme der Mitosen im Tumor auszulösen (Lettré, Hemprich und Spirig 1953). Markierte Zellpartikel können die Membran der Zelle unverändert passieren (Wrba und Giessler 1958). Die Aufnahme großer Moleküle ist mit aktiver Veränderung der Zellmembran verbunden. Büngeler (1930a, b) hat nachgewiesen, daß die Aufnahme von hochmolekularer Substanz, z. B. von großen Proteinmolekülen durch Zellen des retikuloendothelialen Systems, eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme in diesen Zellen verursacht. Die Resorption großer Moleküle und die Phagocytose von Partikeln stellt einen aktiven energieverbrauchenden Vorgang dar. Zur Vermehrung des Energiespiegels ist eine Zelle des RES durch Atmungssteigerung befähigt (Büngeler 1931). Eine Zelle, die große Moleküle aufzunehmen vermag, muß daher über entsprechende Energiereserven verfügen. Die Phagocytose gilt daher mit vollem Recht als Kriterium für die Funktion einer lebenden Zelle.

Die Aufnahme organischer Verbindung durch Zellen unterliegt biologischen Gesetzen. Wiseman und Ghadially (1955) konnten an Zellen eines in vitro mechanisch suspendierten, soliden (ursprünglich durch Dibenzanthracen induzierten) Sarkoms eine intrazelluläre Anreicherung von bestimmten zugesetzten Aminosäuren nachweisen. Andere Aminosäuren wurden dagegen nicht aufgenommen. Eine konzentrierende Aufnahme von Aminosäuren wurde von Christensen, Riggs, Aspen und Mothon (1956) auch an Zellen des MAT beobachtet. Auch der häufig bestätigte Einbau komplizierter organischer Verbindungen, welche als Vorläufer für polymere Zellinhaltsstoffe angeboten werden, beweist die Fähigkeit der Aufnahme für solche Substanzen und ihre elektive Verwendung im Zellstoffwechsel. Rabinovitz, Olson und Greenberg (1954) haben gezeigt, daß die Aufnahme und der Einbau von angebotenen Aminosäuren in zelleigene Proteine an funktionierende Energiequellen der Zelle gebunden ist. Ihnen ist es gelungen, am MAT den Beweis zu führen, daß aus Glykolyse gewonnene Energie für den Einbau von Aminosäuren in Proteine verwertet wird. Zusatz von Dinitrophenol, das vorwiegend oxydative Prozesse blockiert, hemmt den Einbau von Aminosäuren nicht. Auch Heinz (1954) kommt auf Grund der Berechnungen seiner Versuchsergebnisse zu dem Schluß, daß die konzentrierende Aufnahme von Glycin-C^{14} ein stark exothermer Vorgang ist.

Die Zufuhr von Glucose unter aeroben Bedingungen steigert in den Experimenten von Creaser, Leon und Scholefield (1959 die Phosphataufnahme durch MAT-Zellen. Es wurden dabei nur Suspensionen von 6—8 Tage nach der Transplantation entnommenen Tumoren verwendet. Die Zellen wurden in Krebs-Ringerlösung aufgenommen und auf je 3 ml wurden 100 μC P^{32} zugesetzt. Ein Zusatz von 20 mM Glucose bewirkt eine Aufnahmesteigerung und einen vermehrten Einbau des P^{32} in Zellinhaltsstoffe, die mit Trichloressigsäure fällbar sind. Unter anaeroben Verhältnissen wird ohne Glucosezusatz kein Phosphat aufgenommen. Der Zusatz von Glucose bewirkt dagegen die gleiche Aufnahme an P^{32} wie unter aeroben Bedingungen. Miroff und Cornatzer (1958b) kommen damit übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß unter anaeroben Bedingungen

bei Mangel von Glucose der Einbau von Phosphat in Phospholipoide unterbunden ist.

Die Befunde von Zamecnik (1953) stimmen mit diesen Ergebnissen überein. DL-Leucin-1-C^{14} wird von Yoshida-Sarkom anaerob in Proteine eingebaut, wenn Glucose im Medium enthalten ist. Das Leucin wird in einer Stickstoffatmosphäre nicht eingebaut. Der Zusatz von 0,02 M Glucose bewirkt Glykolyse und Leucininkorporation. Zusatz von Dinitrophenol hat keinen Einfluß auf diesen Vorgang. Offenbar wird also bei Gegenwart von Glucose der größte Energiegewinn durch Glykolyse erzielt. Nach Crabtree (1929) führt hohe Glucosekonzentration in einer Suspension zur Atmungshemmung. Im Ascites der MAT-tragenden Maus ist die Glucosekonzentration sehr gering; sie beträgt nicht mehr als 0—10 mg-% (Ibsen, McCarty und McKee 1956). Diese Autoren finden bei einer Glucosekonzentration von 9—18 mg-% in Suspensionen von Zellen des MAT eine Steigerung des Sauerstoffverbrauches. Erhöhung der Glucosekonzentration auf 50—150 mg-% löst eine Atmungshemmung aus. Die durch 50 mg-% Glucose ausgelöste Atmungshemmung wird durch Zusatz von 15—55 mM pro Liter an anorganischem Phosphat teilweise wieder aufgehoben (s. auch Brin und McKee 1956). Atsch und Straub (1954) finden beim umgekehrten Pasteureffekt (= Atmungshemmung durch Glucosezusatz) trotz der Hemmung der Sauerstoffaufnahme einen Anstieg des Zellgehaltes an energiereichem Phosphat. Damit steht die Beobachtung von Ibsen und McKee (1957) im Einklang, daß während der Atmungshemmung und der gesteigerten Phosphorylierung der Gehalt an Phosphorverbindungen, die mit Trichloressigsäure fällbar sind und daher hochmolekular gebundenes Phosphat enthalten, steigt. Welches der limitierende Faktor für die Umschaltung beim steigenden Substratangebot (= umgekehrter Pasteureffekt) ist, bleibt ungeklärt. Ibsen, McCarty und McKee (1956) vermuten eine Konkurrenz der oxydativen und glykolytischen Systeme für ADP. Die Vermutung, daß Phosphatmangel der steuernde Faktor sein könnte, ist nach Seelich, Weigert und Letnansky (1956) unwahrscheinlich. Es besteht kaum ein Zweifel, daß die Tumorzellen durch den Crabtree-Effekt bei ausreichendem Glucoseangebot durch volle Ausnutzung ihrer Glykolyse mehr Energie gewinnen können als bei Einsatz der Atmung (Wrba 1960). Daher wird verständlich, daß suspendierte Zellen des MAT in Gegenwart von hohen Glucosekonzentrationen angebotene hochmolekulare Substanz bis zur Größe von Mitochondrien in hohem Maße aufzunehmen vermögen. Es wird verständlich, daß Proben mit Glucosezusatz schneller aktive Partikel resorbieren und einbauen könnten, als glucosefreie Kontrollen. Die aus dem vermehrten Substratabbau gewonnene Energie wird dazu benutzt, große Bausteine aufzunehmen und anschließend für die zelleigene Synthese zu verwerten. Die in dieser Form aufgenommene Aktivität bleibt in unseren Versuchen im gesamten Beobachtungszeitraum quantitativ innerhalb der Zelle in hochmolekularer Form eingebaut.

Eine ganze Anzahl von Arbeiten beschäftigt sich damit, die Aufnahme markierter anorganischer Substanz — meist von Phosphat — in markierter Form als Maßstab für die Vitalität des Objektes zu verwerten. Der Vorteil dieser Arbeitsweise ist, daß schon sehr kleine Mengen, die unwägbar sind und mit keiner anderen Methode objektivierbar wären, faßbar sind. Jede Stoffwechseländerung muß

ihren Niederschlag in einer Intensivierung oder Hemmung der Phosphorylierungsprozesse finden. So gelang uns der Nachweis stimulierender Wirkung in bestimmten Seren unter Bedingungen, bei welchen andere Methoden versagen mußten, an Organkulturen (Wrba, Ripoll-Gomez und Ranz 1960). Gyllenstein, Ringertz und Ringertz (1956) fanden bei experimentellen Entzündungen am Meerschweinchen eine Verschiebung der Aufnahme an markiertem Phosphat im betroffenen Lymphknoten in Abhängigkeit vom Entzündungsstadium. Kern und Eisen (1959) bestätigten eine ähnliche Verschiebung der Aufnahmegröße in Lymphknotenzellen unter der Wirkung von Antigenen. Thomas und Wilson (1959) finden eine Abhängigkeit der Phosphataufnahme der menschlichen Schilddrüse in Abhängigkeit von ihrer Zelldichte. Gemmel, Laing und Veall (1954) bestimmten die Aktivität von Hautstücken, die zur Transplantation bestimmt waren, und schlossen aus ihrer Aufnahmefähigkeit für markiertes Phosphat auf ihre Vitalität. Curran und Gibson (1956) verwendeten die Aufnahme von markiertem Sulphat-35 als Vitalitätstest für menschliche Knorpelzellen. Ein weiterer Befund verdient bei Betrachtung der Aktivitätsverteilung besondere Beachtung: Bei der Aufbewahrung von Ascitestumorzellen ergibt sich je nach den herrschenden Verhältnissen nach bestimmten, mit der Versuchsanordnung wechselnden Zeiträumen ein Abfall der intrazellulären Aktivität. Er entspricht der Freisetzung von Stoffen aus dem Zelleib in das extrazelluläre Milieu, gibt daher mit großer Schärfe den Augenblick an, von welchem ab die Stoffgabe aus der Zelle die Aufnahme überwiegt. Er zeigt den Zeitpunkt an, von welchem ab der Zellstoffwechsel sich verschlechtert, d. h. den beginnenden Abbau mit Beendigung der Synthese. Dieser Umschlag des Stoffwechsels liegt weit vor dem Auftreten der morphologischen Veränderungen und ist daher als Indikator für die eintretende Vitalitätsminderung besonders kennzeichnend. Darüber hinaus ist es möglich, durch Festlegung der eintretenden Stoffabgabe die Eignung von Konservierungslösungen und Nährbodenfaktoren vergleichsweise zu ermitteln. Für die unter unseren Versuchsbedingungen studierte Asciteszelle liegt der Eintritt der Stoffabgabe in Abhängigkeit von den herrschenden Umweltbedingungen und der Wahl der Suspensionsmedien zwischen 2 und 12 Std der Aufbewahrung in vitro bei 37°. Die Aufbewahrung bei 0° erhält dagegen die Zelle über lange Zeiträume nach Erwärmung aufnahmefähig.

Die strenge Abhängigkeit der Phosphataufnahme unserer Organkulturen von ihrer Stoffwechsellage zeigt, daß diese Methode als Vitalitätstest geeignet ist. Aus der Umkehrung der Fragestellung ergibt sich die Möglichkeit, die Wirkung von Nährböden, Konservierungsmitteln und sonstigen stofflichen Zusätzen zu erproben. Diese Versuchsanordnung ist im Hinblick auf die aktuelle Frage der Einrichtung von Gewebebanken nicht unwesentlich. Darüber hinaus liefert die Methode für alle Fragestellungen der Gewebekultur ein objektives Bezugssystem von höchster Empfindlichkeit. Die objektive Beurteilung und vor allem die Dokumentation von Wirkungen bestimmter Mechanismen oder zugesetzter Substanzen ist in der Gewebekultur sehr fraglich. Nur wachsende Gewebe können nach der Zahl der Mitosen oder nach der Vergrößerung der Oberfläche und ihrer Morphologie beurteilt werden. Für die Beurteilung der Vitalitätslage überlebender Gewebe gibt es kein Kriterium.

Es scheint in diesem Zusammenhang erwähnenswert, daß im morphologisch unveränderten erwachsenen Herzmuskel, unmittelbar nach Entnahme angesetzt

und nach 60 min der Aufbewahrung angesetzt, die Phosphataufnahme während eines anschließenden Kulturzeitraumes von 48 Std um 50% verschieden ist. Diese mit keiner anderen Methode faßbare Wirkung ist dadurch als signifikant bewiesen. Auch die Tatsache, daß bei allen Untersuchungen Organe von embryonalen Individuen auf Grund höherer Stoffwechselintensität und Wachstumsneigung stärker Phosphat aus dem Nährboden aufnehmen als die entsprechenden erwachsenen Organe und daß nur im Falle des Herzmuskels die Sachlage umgekehrt ist, bedeutet eine Sicherung eines sonst nur schwer zu ermittelnden Tatbestandes.

Die Aufnahmeverhältnisse bei Anwendung markierter Glucose scheinen nach den geschilderten Ergebnissen zunächst schwer deutbar zu sein. Besonders fällt auf, daß der höchste Wert für die intrazelluläre Aktivität nach Zufuhr markierter Glucose schon in den ersten Minuten nach dem Zusatz des Traubenzuckers erreicht wird. Bei Raumtemperatur liegt dieses Maximum vor einer Minute des Versuchsablaufes und ist methodisch nicht mehr zu erfassen. Die Aufnahme von Glucose in den von uns angebotenen Mengen ist demnach unter „Normalbedingungen" bei der Ascitestumorzelle schon nach 5 min vollkommen abgeschlossen; und sie erfolgt sozusagen in Sekundenschnelle. Die faßbare abfallende Neigung der Resorptionsgröße zeigt eine Abgabe der Aktivität oder besser einen Umsetzungsvorgang an. 90% des Umsatzes nach Zufuhr von Glucose spielen sich bei Zellen des MAT in den von uns gewählten Konzentrationen innerhalb der ersten 10 min des Versuches ab. Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen von Olson (1951) überein, wonach Schnitte von Rattenhepatomen Glucose schneller oxydieren als normale Leber. Busch, Fujiwara und Keer (1960) beobachten am Walkercarcinom und am Flexner-Jobling-Tumor einen Umsatz von 70—90% der zugeführten Glucose innerhalb der ersten Minute.

Die deutliche Temperaturabhängigkeit dieses Ablaufes der Glucoseumsetzung (Abb. 16) zeigt, daß bei Zimmertemperatur unter physiologischen Temperatur der Glucoseabbau den Aufnahmevorgang von Beginn an überlagert. Sowohl durch Senkung der Versuchstemperatur und die daraus resultierende relative Stoffwechselhemmung als auch durch Blockierung der kohlenhydratabbauenden Enzymsysteme kann eine Erhöhung der in der Zelle auffindbaren Aktivität erreicht werden. Die Hemmung des Glucoseabbaues hat demnach eine scheinbare Steigerung der Aufnahme dieser Substanz zur Folge. Dabei gelingt es, durch Anwendung erniedrigter Temperaturen das Maximum intrazellulärer Aktivität methodisch zu fassen und bis auf 3 min nach dem Zusatz der markierten Substanz zu verschieben. Diese Verschiebung des höchsten Aufnahmewertes ist wahrscheinlich auf eine Herabsetzung der Molekularbewegung und der daraus resultierenden Diffusionsgrößen zurückzuführen.

Es ist festzuhalten, daß Aufnahme und Umsetzung von angebotener Glucose in unserer Dosierung (unter 0,01 mg-%) durch Zellen des MAT nach 5 min praktisch beendet ist und daß mit Beginn der Resorption bei physiologischen Temperaturen für diese Zelle die Aufnahme von Abbau überlagert wird. Von der 15. min an bleibt der Aktivitätswert innerhalb der Zellen konstant. Ein Umsatz erfolgt dann nicht mehr, die in den Zellen noch enthaltene Aktivität ist fest eingebaut.

Aus dieser Feststellung ergibt sich eine Stellungnahme zu der unentschiedenen Frage, ob die Glucoseresorption für die Zelle einen energieverbrauchenden,

aktiven Vorgang darstellt, oder ob dieser Aufnahmevorgang eine aktive Leistung von seiten der Zelle erfordert. Es gibt zur Beantwortung dieser Frage 2 Möglichkeiten der Versuchsanordnung. Die Zelle kann durch Abkühlung und Lagerung gezwungen werden, ihren Energievorrat zu verbrauchen oder die energieliefernden Reaktionen können blockiert werden.

Die schonendste Möglichkeit, die Zelle zu zwingen, ihren Energievorrat zu verbrauchen, ohne sie irreversibel zu schädigen, liegt in einer längeren Aufbewahrung bei 0°. Die Kurven für die Glucoseaufnahme durch sofort untersuchte Zellen und durch Zellen, die 24 Std in glucosefreier Ringerlösung aufbewahrt worden waren, liegen deckungsgleich.

Die Aufnahme des markierten Traubenzuckers ist selbstverständlich an die intakte Zellmembran gebunden. Durch Hitze denaturierte Zellen zeigen keine Inkorporation von Glucose. Der zweite Weg, die Blockierung des Kohlenhydratstoffwechsels (Abb. 21 B, C), liefert extrem hohe und vor allem konstant hochliegende Werte für die intrazellulär nachweisbare Aktivität. Blockierung von Atmung und Gärung durch gleichzeitigen Zusatz von Cyanid und Fluorid stört die Membranfunktion der lebenden Zelle nicht oder in nicht faßbarem Maße. Der hohe Wert aufgenommener Aktivität bleibt innerhalb der Zelle 5 min unverändert. Der bei dieser Versuchsanordnung erzielte Wert für die intrazelluläre Aktivität liegt noch um 30% höher als der durch relative Blockierung des Stoffwechsels durch Abkühlung auf 0° erreichte. Hemmung nur der Atmung (Abb. 21 E) oder nur der Glykolyse (Abb. 21 A) hat entsprechend höhere Werte für die Aufnahme mit anschließendem Abfall innerhalb des Versuchszeitraumes zur Folge. Gegenüber diesen experimentell beeinflußten Versuchsreihen zeigt die „normale" Umsatzkurve der gleichen Zellsuspension bei Raumtemperatur (19°) infolge der Abbauüberlagerung niedrige Werte und den üblichen Verlauf der Aktivitätsverteilung (Abb. 15 F). Seit langem wird die Frage diskutiert, ob die Glucosepassage durch die Zellmembran ein aktiver Vorgang ist. Diese Diskussion findet ihren Niederschlag in einer Fülle von Literatur (Zusammenstellung bei Haas 1955). Aus unseren Befunden ergibt sich, daß beim Angebot von Glucose 2 Größen zu beachten sind: *Aufnahme* und *Umsatz*. Die Aufnahme der Substanz ist an die intakte Funktion der Membran der Zelle gebunden. Der Umsatz hängt von der Integrität der Fermentsysteme im Kohlenhydratstoffwechsel ab. Nicht die Höhe der intrazellulären Aktivität nach Aufnahme von Glucose, sondern vielmehr der Grad des Abfalles oder besser gesagt des Umsatzes, gibt einen Hinweis auf die Stoffwechselleistung einer suspendierten Zellpopulation.

Um diese Feststellung sichern zu können, waren Mechanismen zu suchen, die eine kontinuierliche Vitalitätsminderung in Abhängigkeit von ihrer Dosierung verursachen. Besonders geeignet für eine dosierbare Schädigung schien die Wirkung von Röntgenstrahlen oder toxischen Substanzen.

Eine Röntgenbestrahlung mit niedrigen Dosen führt zu signifikanter Erhöhung der Aktivität innerhalb der Zellen nach Zufuhr markierter Glucose, demnach zu einer Herabsetzung des Glucoseumsatzes. Bei der Bestrahlung mit hoher Röntgendosis steht im Vordergrund eine Membranschädigung. Die Aktivitätsbilanz ergibt, daß nach 5 min nur 7,5% der Gesamtaktivität intrazellulär nachweisbar sind. Die größte Menge der zugeführten Glucose bleibt extrazellulär im Medium. Es finden sich (Tabelle 4) 78% extrazellulär gegenüber 53,5% der

Aktivität bei unbestrahlten Zellen. Auch der oxydative Abbau ist erheblich gestört. Nur 14,5% der Glucoseaktivität gehen durch Veratmung aus dem System verloren, während bei den nichtbestrahlten Zellen zum gleichen Zeitpunkt bereits 33% der Aktivität veratmet sind. Interessant ist bei der Beurteilung der Glucoseaufnahme die aus dem Kurvenverlauf ablesbare Dissozierbarkeit von Substratphosphorylierung und oxydativer Phosphorylierung beim MAT. Bei Senkung der Versuchstemperatur kommt es zunächst zur relativen Hemmung der Atmung. Dabei bleibt die Glycolyse bei Zellen des MAT erhalten (Abb. 16). Der noch vorhandene geringe Umsatz bei 0^0 (vgl. Abb. 21 D und 21 A u. B) ist auf Glykolyse zurückzuführen. Die Überlagerung der Aufnahme durch den Abbau ist in der ersten Phase des Versuches auf oxydativem Abbau zurückzuführen. De mentsprechend findet sich ein Verlust von einem Drittel der zugeführten Aktivität in Form von CO_2 innerhalb der ersten Minute aus dem Ansatz. Mit fallender Versuchstemperatur verschiebt sich das Maximum der intrazellulären Werte auf spätere Zeitpunkte des Versuches. Die Gärung baut also in der zweiten Phase vorhandene Glucose zu Lactat ab. Dementsprechend entsteht im weiteren Verlauf kein CO_2 mehr. Die im System erhalten gebliebene Aktivität findet sich in steigendem Maße in Form von Milchsäure (Busch, Fujiwara und Keer 1960). Im Falle der Atmungshemmung (Abb. 21 E) entsteht eine Kurve, die kennzeichnenderweise mit derjenigen nach Röntgenschädigung nahezu identisch ist.

Eine besondere Wirkung war durch Zusatz von Butazolidin (Phenylbutazon) in verschiedener Konzentration zu erwarten. Delfel und Griffin (1953) finden bei einer Dosis von 10 mg-% an Butazolidin einen vermehrten Einbau von P^{32} in die Kernnucleinsäuren sowohl 3 Std nach Zufuhr der Substanz als auch 6 Tage nach Beginn des Versuches. Pulver, Exer und Herrmann (1956) beobachteten bei Verwendung therapeutischer Dosen eine Aktivierung der Atmung von Lebermitochondrien. Exer (1956) findet bei einer Dosis von 10 mg-% eine Aktivierung der Oxydation im Krebszyklus von Mitochondrien der Rattenleber. Bässler und Lang (1956) stellen bei der gleichen Dosis keine Hemmung der Atmung und der Glykolyse an isolierten Mitochondrien fest (s. Zusammenstellung bei Rechenberg 1957). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigt sich nach Zusatz von 10 mg-% Butazolidin gleichzeitig mit markierter Glucose eine Abbaukurve, die mit der butazolidinfreien Umsetzungskurve übereinstimmt. Der intrazelluläre Abbau liegt dabei von der 3. Minute an sogar tiefer als im Kontrollansatz. Daraus darf geschlossen werden, daß eine Intensivierung der Atmung stattgefunden hat und ein größerer Teil der angebotenen Glucose oxydativ verwertet wurde. Die Aktivitätsbilanz stimmt dabei mit der Bilanz der unbehandelten Zellen nach 3 min noch überein. Eine Dosis von 10 mg-% an Butazolidin stört den Glucoseabbau in Suspensionen von Zellen des MAT also nicht und intensiviert auf Grund einer Atmungssteigerung des oxydativen Abbau.

Die hohe Dosierung von 1 g-% Butazolidin im Suspensionsmittel hat in der gleichen Zellpopulation dagegen einen erheblichen Hemmeffekt (Abb. 28). Die Aktivitätswerte liegen mit einem Maximum bei 2 min für die behandelten Zellen wesentlich höher. Die intrazelluläre Aktivität verringert sich dabei nur in geringem Maße. Offenbar ist eine Schädigung der Membranfunktion der Zelle nicht eingetreten. Die Hauptwirkung scheint in einer Schädigung der Atmungskettenphosphorylierung zu bestehen.

Glucose in der von uns angebotenen Menge wird von Suspensionen aus Zellen des MAT quantitativ aufgenommen und umgesetzt. Dieser Umsatz erfolgt zu 90% innerhalb der ersten 5 min. Es gibt eine optimale Glucosekonzentration, bei welcher der oxydative Abbau der Glucose voll ausgenutzt wird. BRIN (1953) beobachtet bei höherem Angebot von Glucose starke Anreicherung von Milchsäure, die über Stunden liegenbleibt. Andererseits vermögen MAT-Zellen zugesetztes C^{14}-markiertes Lactat und Pyruvat zu oxydieren (BLOCH-FRANKENTHAL und RAM 1959). Glucosezusatz hemmt auch die Oxydation dieser Substrate. Alles weist darauf hin, daß es sich bei der Beurteilung von Glucoseabbau und Verwertung durch Zellen des MAT in erster Linie um die Frage der Glucosekonzentration im Medium handelt.

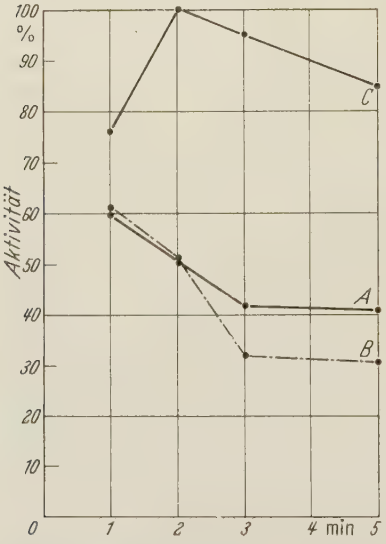


Abb. 28. Aufnahme und Umsatz von markierter Glucose unter der Wirkung von Butazolidin durch Zellen des MAT in vitro. *A* unbehandelt; *B* Zusatz von 10 mg-% Butazolidin; *C* Zusatz von 1,0 g-% Butazolidin

Der Umsatz an Glucose in der von uns gewählten Konzentration, die unter 0,01 mg-% an aktiver Substanz liegt, erfolgt zu 90% innerhalb der ersten Versuchsminuten. Ein Teil der angebotenen Aktivität in der Größenordnung von etwa 10% des zugeführten Wertes (Abb. 20) wird dabei fest eingebaut. Ein wesentlich größerer Teil wird jedoch in CO_2 umgesetzt und geht schon innerhalb 1 min in Form von Kohlendioxyd aus der Suspension verloren. Die Bilanz der Verteilung der angebotenen Aktivität ergibt, daß nach 1 min schon ein Drittel der zugeführten Aktivität in Kohlendioxyd umgewandelt ist. Dieser Wert erhöht sich bis zur 5. min nicht mehr wesentlich und bleibt von da ab konstant (Abb. 20), d. h., daß der Glucoseumsatz über den Citronensäurezyklus innerhalb von 5 min abgeschlossen ist. Weiterer Abfall der intrazellulären Aktivität geht nicht mehr zugunsten von CO_2-Bildung vor sich, sondern durch Bildung von Milchsäure.

Aus der Erkenntnis, daß die markierte Substanz bei dem in unseren Versuchen gewählten Zusatz von Glucose praktisch quantitativ umgesetzt wird, ergibt sich die Frage nach der Begrenzung des Glucoseumsatzes.

IBSEN, MCCARTY und MCKEE (1956) weisen darauf hin, daß Konzentrationen von 9—18 mg-% an Glucose die Aufnahme von Sauerstoff durch Zellen des MAT steigern. Konzentrationen an Traubenzucker unterhalb der kritischen Dosierung für die Auslösung des CRABTREE-Effektes haben Atmungssteigerung und einen vermehrten oxydativen Glucoseabbau zur Folge. Die MAT-Zellen können, wesentlich mehr als die von uns angebotene Konzentration an Glucose oxydativ abzubauen. Unter Beachtung der Befunde von IBSEN, MCCARTY und MCKEE (1956), daß die Glucosekonzentration im extrazellulären Milieu des Ehrlichschen Ascites außerordentlich gering ist, wird verständlich, daß die geringen, von uns angebotenen Glucosekonzentrationen innerhalb 1 min schon zu 30% veratmet sind.

Die Steigerung der Atmung durch geringe Konzentrationen von zugegebener Glucose wurde auch durch Bloch-Frankenthal und Weinhouse (1957) bestätigt. Daß diese Atmungssteigerung mit gesteigertem oxydativem Abbau an Glucose verbunden ist, beweisen Wenner und Weinhouse (1956) durch Verwendung C^{14}-markierter Glucose. Auch Brin und McKee (1956) finden unterhalb einer Konzentration von 30 mg-% an Traubenzucker am Ascitestumor eine Atmungssteigerung. Ibsen und McKee (1957) beobachten eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme am Ehrlichschen MAT durch Zusatz von Glucose bis zu einer Konzentration von 1 mM.

In unseren Versuchen war leicht nachzuweisen, daß in isotonischer Glucoselösung suspendierte Zellen ähnlich wie gekochte Zellen reagieren. Sie nehmen keine markierte Glucose auf. Vergleichsweise in glucosefreier Ringerlösung und in Hankscher Lösung (100 mg-% an Glucose) suspendierte Zellen zeigen unterschiedliches Verhalten. Im Falle der Glucoselösung finden sich eine Verschiebung des intrazellulär nachweisbaren Maximums und gegenüber der Ringerlösung erhöhte Werte der intrazellulären Aktivität. Zusatz inaktiver Glucose zur immer gleichen Menge C^{14}-markierten Traubenzuckers führt in Konzentrationen bis zu 1 mg-% zu den gleichen Resorptionsverhältnissen, die denen bei Zufuhr unserer üblichen aktiven Glucosemenge entsprechen. Bei einer Konzentration von 10 mg-% zeigt sich ein beginnender Anstieg der Aktivitätswerte und die Verschiebung des intrazellulären Höchstwertes auf die zweite Versuchsminute. Bei weiterer Steigerung des Zusatzes an inaktiver Glucose ergeben sich sehr niedrige Werte intrazellulärer Aktivität mit deutlich nachweisbarer Hemmung des Glucoseabbaues.

Nach diesen Befunden gibt es wie für die Phosphatresorption auch für die Glucoseverwertung eine optimale Konzentration. Ein Anstieg der Konzentration über dieses Optimum führt zunächst zu einer Steigerung der intrazellulär nachweisbaren Aktivität, welche anzeigt, daß der Umsatz nicht mit der Aufnahme Schritt halten kann. Der oxydative Abbaumechanismus ist überfordert. Im Falle der Glucoseresorption der Ascitestumorzelle ist die Sachlage infolge des sog. umgekehrten Pasteureffektes kompliziert. Crabtree (1929) fand an Schnitten aus soliden Tumoren eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch hohe Glucosekonzentration. Sie ist an Ascitestumoren in noch stärkerem Maße nachweisbar.

Die Fähigkeit einer ganzen Reihe von Tumoren, Glucose vollständig zu oxydieren, wurde von zahlreichen Untersuchern nachgewiesen (Olson 1951, Weinhouse 1955 u. a.). Tumoren verfügen demnach ohne Zweifel über die vollständige Ausrüstung zur Veratmung der Glucose. Die geringe Menge an markierter Glucose, welche in unseren Versuchen angeboten wird, liegt weit unter der Grenze für die Auslösung der Atmungshemmung und ist der Oxydation zugänglich. Die Begrenzung, welche sich aus der Erschöpfung der Atmung bei noch vorhandenem Substrat ergibt, muß ihre Ursache in der oxydativen Kapazität der Geschwülste haben. Wenner und Weinhouse (1953) erreichten durch Zusatz von DPN eine rasche Oxydation von Pyruvat durch isolierte Tumormitochondrien. Sie schließen auf eine ungenügende Verbindung zwischen dem an sich vorhandenen DPN und den Mitochondrien der Geschwulst.

Diese Befunde schränken die erörterten Ergebnisse insofern ein, als Aussagen über die Stoffwechsellage und Funktion der untersuchten Zellen auf Grund der Verwertung markierter Glucose nur bei gleichem physiologischem Glucosegehalt der zu untersuchenden Proben möglich sind. Im extremen Fall verhält sich die abgetötete Zelle hinsichtlich der Verwertung angebotenen Traubenzuckers wie die mit Glucose abgesättigte Zelle.

Nach den Beobachtungen über die Glucoseverwertung durch andere Zellarten reagieren Zellen des Sarkoms 37 in ähnlicher Weise auf den Zusatz unwägbarer Mengen markierter Glucose wie die Zellen des MAT. In Anbetracht der Ähnlichkeit dieser Geschwulst in ihrem Wachstumsverhalten, ihrer Zellzahl und ihrem sonstigen Kennzeichen mit dem MAT, wird man annehmen dürfen, daß dabei auch hinsichtlich der Glucoseverwertung gleiche Verhältnisse herrschen. Über den Gehalt an Glucose im nativen Tumor finden sich für diesen Ascites keine Angaben. Die Annahme liegt nahe, daß die Größenordnung des Traubenzuckerspiegels dabei die gleiche sein wird wie beim MAT. Wesentlich anders ist jedoch die Sachlage für die übrigen verwendeten Gewebe. Die Zellen aus Suspensionskulturen wachsen auf einem glucosereichen Nährboden und dürften daher mit Glucose ausreichend versorgt sein. Die zugeführte Substanz wird daher von den Zellen des Stammes L und den A4-Zellen langsam und kontinuierlich aufgenommen. Die entsprechende Kurve veranschaulicht nur die Einwanderung der markierten Substanz, nicht die oxydative Umsetzung überlagert. Es ist bemerkenswert, daß beide Zellarten entsprechend ihren gleichgearteten Wachstumsbedingungen und ihrer gleichen Umwelt übereinstimmende Ergebnisse liefern. Erstaunlich ist dagegen, daß sowohl die Zellen des Yoshida-Sarkom in Ascitesform als auch die entsprechenden Zellen des Walker-Carcinom Glucose in ähnlicher Weise wie Suspensionskulturen aufnehmen. Die Aufnahme von Glucose durch Ascitestumorzellen dieser beiden Rattengeschwülste unterscheidet sich dabei in charakteristischer Weise von dem Verhalten der Zellen des MAT und des Sarkoms 37. Dabei nehmen auch Zellen dieser beiden Geschwülste, die nach heterologem Wachstum von der Maus gewonnen wurden, in gleicher Weise Traubenzucker auf wie die entsprechenden Zellen der Ratte. Ob es sich bei der langsamen Glucoseaufnahme um eine Eigenschaft handelt, die durch die primäre Herkunft dieser Geschwulst von der Ratte determiniert wurde oder ob bei diesen Geschwülsten die Konzentration an Glucose im Medium höher liegt, ist nicht geklärt. Angaben über die Glucosekonzentration in diesen Geschwülsten liegen nicht vor. Diese beiden Ascitestumoren geben ähnlich wie Zellen aus der Gewebekultur in Suspension kontinuierlich ansteigende Resorptionskurven und zeigen keinerlei oxydativen Abbau der angebotenen Substanz. Ein Verlust an radioaktiver Substanz durch entweichendes $C^{14}O_2$ tritt dabei nicht ein, vermutlich deswegen, weil die Konzentration an Traubenzucker bei diesen Geschwülsten ähnlich wie in der Gewebekultur so hoch ist, daß der Zusatz an aktiver Glucose schon im Zustand der blockierten Atmung erfolgt. Die angebotene und aufgenommene markierte Glucose wird offenbar über die Glykolyse abgebaut.

Für die Deutung dieser Zusammenhänge ist es wichtig, klarzustellen, worin der limitierende Faktor für die Glucoseverwertung durch die Zelle zu suchen ist. Siekevitz und Potter (1953) haben Untersuchungen über den oxydativen Abbau

durch normales und malignes Gewebe mit Hemmung und Förderung des Abbaues an energiereichem Phosphat ausgeführt. Sie fanden, daß verschiedene Tumoren eine unterschiedliche oxydative Kapazität besitzen. Der Zusatz von Dinitrophenol, der den Abbau von energiereichem Phosphat fördert oder der Zusatz von Fluorid, das diesen Abbau hemmt, wirken von Geschwulst zu Geschwulst verschieden. Die oxydative Kapazität aller Tumoren ist gleichmäßig geringer als die normaler Gewebe.

Zamecnik und Stephenson (1950) beobachteten eine Beschleunigung der Aufnahme von Aminosäuren bei Gegenwart von Glucose. Unsere Befunde über den beschleunigten Einbau phosphatmarkierter Partikel bei Gegenwart von Glucose wiesen in die gleiche Richtung. Auch die Beobachtung von Miroff und Cornatzer (1958b) über den verstärkten Phosphateinbau bei Glucosezusatz sprechen für eine besondere Beziehung zwischen glykolytischem Glucoseabbau und Syntheseleistung der Zelle. Diese Beobachtungen liefern eine Erklärung für die aerobe Glykolyse der Tumoren. Auf dieser Grundlage hat Lettré (1951 und 1953) die unvollständige Oxydation der Kohlenhydrate in ihrer Bedeutung für wachsendes und malignes Gewebe erläutert und auf die Zusammenhänge zwischen Stoffwechsel und Wachstum hingewiesen.

Die Beschränkung der oxydativen Kapazität läßt sich bei unserer Versuchsanordnung leicht veranschaulichen. Der übliche Zusatz an markierter Glucose in einer Größenordnung, die kleiner ist als 0,01 mg-%, wird sehr rasch oxydiert. Gärungsvorgänge spielen unter diesen Versuchsbedingungen bei Zellen des MAT kaum eine Rolle. Schon die Erhöhung der Glucosedosis auf 10 mg-% hat das Auftreten eines Atmungshemmungseffektes (Crabtree-Effekt) und einer Glykolysekurve zur Folge. Glucosezusatz hemmt die Milchsäure- und Brenztraubensäure-Oxydation stärker als die Sauerstoffaufnahme (Bloch-Frankenthal und Ram 1959). Brin (1953) findet nach Inkubation von Zellen des MAT in Ringerlösung mit Zusatz von 5 g Glucose über 3 Std ansteigende und weitere 2 Std fallende Milchsäureproduktion. Von der 5. min unserer Versuche ab wird die Glucose nur noch zugunsten von Milchsäurebildung abgebaut. Olson (1951) nimmt an, daß Adenosintriphosphat von Prozessen der oxydativen Phosphorylierung zur Substratphosphorylierung abwandert und daß der terminale Oxydationszyklus der Geschwulst das Angebot an 3-C-Verbindungen aus der aktiv funktionierenden Glykolyse nicht bewältigen kann.

Ganz allgemein ist offenbar der Anstieg der intrazellulären Aktivität nach Zusatz von markierter Glucose Ausdruck intakter Zellmembran und Maßstab für den Glucosebedarf der Zelle. Die absolute Höhe der intrazellulären Aktivität bei Hemmung des Kohlenhydratstoffwechsels, etwa durch Senkung der Versuchstemperatur, liefert einen Hinweis auf die Funktion der Membran. Die Glucoseaufnahme muß bei der MAT-Zelle ohne Energieverbrauch vonstatten gehen. Experimentelle Energieverarmung der Zelle hat keine Verzögerung der Glucoseresorption zur Folge. Der Zeitpunkt des Auftretens eines Maximum an intrazellulärer Aktivität und der Abfall dieses Wertes als Ausdruck der Glucoseumsetzung gibt über die Integrität der energieliefernden Reaktion Aufschluß. Dabei läßt sich die oxydative Kapazität des verwendeten Zellmateriales durch die

Aufstellung einer Aktivitätsbilanz bestimmen. Hemmstoffwirkung, Temperaturveränderung und Variation der Glucosedosierung bieten die Möglichkeit, Atmung und Gärung zu dissoziieren und als Teilvorgänge zu veranschaulichen.

Die besprochenen Untersuchungen zeigen mehrere Möglichkeiten auf, um zu einer Aussage über Stoffwechsellage, Syntheseleistung und Funktionstüchtigkeit einer Zellpopulation zu gelangen:

1. Durch Angebot kleiner Moleküle, etwa wie in unserem Falle markierter Phosphationen, einen Hinweis auf die vitale Resorptionsleistung, die Aktivität der Phosphorylierungsprozesse und im weiteren Verlauf des Versuches bei Beurteilung des Einbauweges dieser Substanz, einen Maßstab für die Syntheseleistung zu erhalten.

2. Durch Angebot hochmolekularer markierter Verbindungen, gegebenenfalls unter gleichzeitiger Einwirkung zugesetzter Glucose und mit Aufschlüsselung der Zellinhaltsstoffe in Hoch- und Niedermolekulare einen Schluß auf den Einbau der angebotenen Substanz und auf den Energievorrat der Zelle zu ermöglichen.

3. Durch Zusatz markierter Substanz zum Nährboden von Organkulturen einen Einblick in die Stoffwechsellage explantierter organisierter Gewebe zu gewinnen und die Wirkung von Versuchsmechanismen an Hand der Substanzaufnahme zu beurteilen.

4. Durch die Bestimmung der Aufnahme markierter Glucose bei blockiertem Kohlenhydratstoffwechsel zu einer Aussage über die Membranfunktion und den Glucosegehalt der Zellen zu gelangen.

5. Durch einen zu einem beliebigen Zeitpunkt ausgeführten Zusatz von markierter Glucose mit Bestimmung der Aktivitätsverteilung, ein Kriterium für die Integrität der energieliefernden Reaktion zu gewinnen.

Diese Arbeitsweise hat den Vorteil, daß sie einfach und am lebenden Gewebe ohne Schädigung anwendbar und reproduzierbar ist. Sie ist auch für die Untersuchung der vitalen Funktionen von Einzellern, Viren und isolierten Zellbestandteilen geeignet.

Zusammenfassung

Die Aufnahme und der Umsatz angebotener, radioaktiv markierter Substanzen zeigt unter kontrollierbaren Bedingungen eine hohe direkte Abhängigkeit von der Vitalität der Zelle.

Anorganisches Phosphat wird durch Zellen in dem gleichen Maße aufgenommen wie das Phosphation innerhalb der Zelle organisch gebunden wird.

Ascitestumorzellen nehmen entsprechend der Verschlechterung ihrer Stoffwechselsituation mit steigendem Abstand von der Überimpfung in vitro geringere Mengen von anorganischem Phosphat auf. Daß diese Aufnahme in vivo spezifisch für den angebotenen Stoff ist, zeigt sich darin, daß Aufnahme und Verwertung in der Zelle in Abhängigkeit von der Bindungsform der angebotenen Substanz verschieden korreliert sind.

Zur Ausschaltung von Fehlerquellen wurde ein Rührsystem entwickelt, in welchem die Aufnahme und der Umsatz angebotener Verbindungen durch suspendierte Zellen in vitro untersucht werden kann. Für anorganisches Phosphat ergibt sich in vitro eine Abhängigkeit der Aufnahmegröße vom Phosphatgehalt des Suspensionsmittels und von der Vitalität der verwendeten Zelle.

Die Aufnahme höhermolekularer Verbindungen ist mit Energieverbrauch verbunden. Die Resorption solcher Verbindungen und mikroskopisch sichtbarer Partikel läßt sich durch Zusatz von Glucose beschleunigen. Ihr Ablauf gibt einen Hinweis für den Energievorrat der Zelle. Eine anschließende Trennung der Aktivität aus niedermolekularen und hochmolekularen Zellinhaltsstoffen liefert einen Hinweis für die Syntheseleistung der Zelle.

Organkulturen bieten die Möglichkeit, die Aufnahme definierter Substanzen auch an organisierten Gewebsverbänden verschiedener Herkunft in Beziehung zu ihrer Vitalität zu bringen. Die Methode ist zur Objektivierung auf andereWeise nicht faßbarer Wirkungen geeignet. Organexplantate nehmen aus dem Nährboden markiertes Phosphat in einem Maße auf, das der Intensität ihres Stoffwechsels proportional ist. Denaturierte Explantate nehmen keine Aktivität auf. Embryonale Organe verwerten Phosphat aus dem Nährboden in höherem Maße als die entsprechenden erwachsenen Organe. Den Herzmuskel nimmt infolge seines höheren Nährstoffbedarfes als ausdifferenzierter Muskel mehr aktives Phosphat auf als der embryonale Herzmuskel.

C^{14}-markierte Glucose wird in vitro bei einer Dosierung unter 0,01 mg-% von Zellen des MAT quantitativ innerhalb von 5 min aufgenommen und umgesetzt. Bei Raumtemperatur ist der oxydative Abbau des Traubenzuckers schon nach 1 min nahezu beendet. Dabei sind 28% der Aktivität in $C^{14}O_2$ verwandelt. Diese von uns gewählte Aktivitätsmenge liegt weit unter der Grenze für die Auslösung der Atmungshemmung durch den sog. „umgekehrten Pasteureffekt". In dieser Größenordnung verursacht Glucose eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme.

Andere Gewebe, Zellen aus Suspensionskulturen und Zellen des Yoshida- und Walker-Tumors nehmen dagegen C^{14}-markierte Glucose kontinuierlich ansteigend auf. Dieser Vorgang entspricht der höheren Glucosekonzentration in diesen Geweben. Nur Zellen des Sarkoms 37 in Ascitesform reagieren wie die Zellen des MAT auf den Glucosezusatz und haben demnach den gleichen niedrigen Gehalt an Glucose im nativen Medium.

Blockierung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Hemmstoffwirkung oder durch Herabsetzung der Versuchstemperatur hat infolge der eintretenden Abbauhemmung eine scheinbare Erhöhung der Aufnahme zur Folge. Bei Zellen des MAT wird die Glucoseaufnahme von Anfang an vom oxydativen Abbau der Substanz überlagert.

Herabsetzung der Vitalität der Zellen, etwa durch Röntgenbestrahlung oder Substanzwirkung, hat von einer kritischen Grenze der Schädigungsintensität eine Abbaustörung und damit einen Anstieg der intrazellulären Aktivität zur Folge. Die Umsetzungsgeschwindigkeit für aufgenommene Glucose, die sich in einem Abfall der intrazellulären Aktivitätswerte zeigt, liefert einen Hinweis auf die Integrität der energieliefernden Reaktion.

Erhöhung des Glucoseangebotes hat bis zu 1 mg-% keine faßbare Wirkung. Von 10 mg-% ab steigt der intrazelluläre Aktivitätswert, weil der oxydative Abbau blockiert wird. Von höheren Dosen ab erlischt infolge der Absättigung der Zelle jede Glucoseaufnahme.

Durch geeignete experimentelle Bedingungen kann man, die in der ersten Minute ablaufende oxydative Phosphorylierung und die anschließend einsetzende Glycolyse bis zu einem gewissen Grade dissoziieren. Die Aufnahme von Glucose durch Zellen des MAT hängt von der intakten Funktion des Zellmembran ab und erfordert keinen Energieaufwand durch die Zelle. Auch Zellen, die gewungen wurden, ihren Energievorrat zu verbrauchen oder Zellen, deren energieliefernde Reaktionen gehemmt wurden, können Glucose resorbieren.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, um zu einer Aussage über die Vitalität einer Zellpopulation zu gelangen.

1. Man kann, durch Angebot kleiner, auch anorganischer Moleküle und mittels der späteren Trennung der Zellinhaltsstoffe und durch die Beurteilung des Einbaues der angebotenen Substanz zu einer Aussage über Resorptions- und Syntheseleistung des Zellmateriales gelangen.

2. Es ist möglich, durch Angebot hochmolekularer definierter Verbindungen oder durch Zufuhr von markierten Zellgranula und durch die Beurteilung ihrer Aufnahme und Verwertung Aufschlüsse über den Energievorrat der Zelle erhalten. Die Aufnahme großer Moleküle durch die Zellmembran — die Phagocytose — ist ein energieverbrauchender Vorgang. Er kann durch gesteigertes Angebot von Traubenzucker bei Zellen des MAT beschleunigt werden.

3. Es gelingt, durch Untersuchung der Substanzaufnahme aus dem Nährboden durch Organkulturen sehr feine, mit keiner anderen Methode faßbare Schwankungen in der Stoffwechsellage der Explantate zu objektivieren. Auf diese Weise läßt sich die Eignung von Nährböden oder Konservierungsflüssigkeiten besonders zuverlässig bestimmen.

4. Bei Blockierung des Kohlenhydratstoffwechsels liefert die Untersuchung der Aufnahme angebotener C^{14}-markierter Glucose einen Hinweis auf die erhaltene Membranfunktion.

5. Durch einen Zusatz sehr geringer Konzentrationen markierter Glucose und die anschließende Bestimmung der Verteilung der Aktivität auf Zellen und Suspensionsmittel ist es möglich, an Zellen des MAT ein Kriterium für die Integrität der energieliefernden Reaktionen zu gewinnen.

Literatur

Atsch, G., u. F. B. Straub: Über den Stoffwechsel der Asciteskrebszellen. Dokl. Akad. Nauk. USSR. **95**, 1021 (1954).

Bässler, K. H., u. K. Lang: Zur Wirkung von Butazolidin im Intermediärstoffwechsel. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. **229**, 568—579 (1956).

Bayreuther, K.: Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. Z. Naturforsch. **7**b, 554 (1952).

Bloch-Frankenthal, L., and D. Ram: The relationship between the crabtree effect and the oxidative metabolism of glucose and carbohydrate intermediates in ascites tumor cells. Cancer Res. **19**, 835—842 (1959).

—, and S. Weinhouse: Metabolism of neoplastic tissue. XII. Effects of glucose concentration on respiration and glycolysis of ascites tumor cells. Cancer Res. **17**, 1082—1090 (1957).

Brin, M.: The production of L (+) lactate by Ehrlich mouse ascites tumor. Cancer Res. **13**, 748—750 (1953).

—, and R. W. McKee: The inhibition of respiration by glucose, fructose and mannose in the Ehrlich mouse ascites tumor. Cancer Res. **16**, 364—368 (1956).

Büngeler, W.: Die Beeinflussung des Organstoffwechsels durch parenterale Reizkörperzufuhr. Frankfurt. Z. Path. **39**, 416—402 (1930a).

— Der Organstoffwechsel bei Gewebsaktivierung und Anaphylaxie. Verh. der Dtsch. Ges. Path. 25. Tagg 1930b, S. 125—127.

Büngeler, W.: Die Gewebsatmung bei der Anaphylaxie. Z. ges. exp. Med. **75**, 223 (1931).

— Die Defination des Geschwulstbegriffes und die Abgrenzung der Hyperplasien gegenüber den Geschwülsten. Verh. der Dtsch. Ges. Path. 35. Tagg, 1951, S. 10—28.

Busch, H., E. Fujiwara and L. M. Keer: Metabolic patterns for glucose-1-C^{14} in tissues of tumor-bearing rats. Cancer Res. **20**, 50—61 (1960).

Calvin, M.: Die chemische Evolution und der Ursprung des Lebens. Naturwissenschaften **43**, 387—393 (1956).

Cassel, W. A.: Maintenance at low temperatures of the Ehrlich ascites carcinoma of the mouse. Cancer Res. **17**, 48—51 (1957).

Chang, M. C.: The effects of low temperature on fertilized rabbit ova stored at different temperatures. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **68**, 680 (1948).

Christensen, H. N., T. R. Riggs, A. J. Aspen and S. Mothon: Concentrative uptake of amino acids by free-cell neoplasmas. Ann. N.Y. Acad. Sci. **63**, 983—987 (1956).

Crabtree, H. G.: Observations on carbohydrate metabolism of tumors. Biochem. J. **23**, 536 (1929).

Creaser, E. H., R. P. DeLeon and P. G. Scholefield: P^{32} Incorporation by Ehrlich Ascites cells in vitro. Cancer Res. **19**, 705—712 (1959).

Curran, R. C., and T. Gibson: The uptake of labelled sulphate by human cartilage cells and its use as a test for viability. Proc. roy. Soc. B **144**, 572—576 (1956).

Delfel, N. E., and A. C. Griffin: Liver nucleic acid incorporation of phosphorus^{32} in rats injected with phenylbutazon. Stanf. med. J. **11**, 65—68 (1953).

Dunnebacke, T. H., and E. M. Zitcer: Preparation and cultivation of primary human amnion cells. Cancer Res. **17**, 1043—1046 (1957).

Earle, W. R., E. L. Schilling, I. C. Bryant and V. J. Evans: Growth of pure strain L cells in fluid suspension cultures. J. nat. Cancer Inst. **14**, 1159—1171 (1954).

Eaton, M. D., A. R. Scala and M. Jewell: Methods for measuring viability of ascites cells. Dye exclusion and respiration as affected by depletion, poisons and viruses. Cancer Res. **19**, 945—953 (1959).

Exer, B.: Über die Wirkung von Phenylbutazon auf den Tricarbonsäurezyklus und andere Fermentsysteme. Experientia (Basel) **12**, 294 (1956).

Fell, H. B., and R. Robison: The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femors and limb buds cultivated in vitro. Biochem. J. **23**, 767 (1929).

Gemmel, W., J. E. Laing and N. Veall: The uptake of ^{32}P as an "vitro" test of the viability of stored skin. Radioisotope Conference 1954, I. Proc. of the second Conference Oxford, p. 107—111. London: Butterworths & Co. 1954.

Gourley, D. R. H., and J. T. Matschiner: Rates of exchange of phosphate. J. cell. comp. physiol. **41**, 225 (1953).

Gyllenstein, L., N. Ringertz and N. R. Ringertz: The uptake of labelled phosphate in lymph nodes during experimental lymphadenitis in relation to the morphological picture. Acta path. microbiol. scand. **38**, 81—95 (1956).

Haagen, E., u. P. G. Seeger: Arbeiten am Tumorascites der Maus. Die Abhängigkeit der Übertragbarkeit des Tumorascites von der Vitalität der Zellen und von der Temperatur. Z. Krebsforsch. **47**, 394—412 (1938).

Haas, J.: Physiologie der Zelle. Berlin: Gebrüder Bornträger 1955.
Hart, W., u. H. Wrba: Zur Überlebenszeit von Tumorzellen in vitro unter anaeroben Bedingungen. Z. Krebsforsch. **60**, 256—258 (1954).
Hauschka, Th. S., and A. Levan: Characterization of five ascites tumors with respect to chromosome ploidy. Anat. Rec. **111**, 467 (1951).
Heinz, E.: Kineticstudies on th "influx" of glycine-1-C^{14} into the Ehrlich mouse ascites carcinoma cell. J. biol. Chem. **211**, 781—790 (1954).
Hevesy, G., and J. Ottesen: Rate of formation of nucleic acid in organs of rat. Acta physiol. scand. **5**, 237 (1943).
Holzer, H.: Enzychemischer Angriffspunkt einiger Tumor-wirksamer Chemotherapeutika. Medizinische **1956**, 576.
Ibsen, K., B. McCarty and R. W. McKee: Phosphate content of Ehrlich's ascites tumor cells and its importance in metabolism. Fed. Proc. **15**, 1 (1956).
Ibsen, K., and R. W. McKee: Phosphate metabolism of Ehrlich's ascites carcinoma cells. Fed. Proc. **16**, 1 (1957).
Kaltenbach, J.P., M.H. Kaltenbach and W. B. Lyons: Nigrosin as a dye for differentialing live and dead ascites cells. Exp. Cell. Res. **15**, 112—117 (1958).
Kern, M., and H. N. Eisen: The effect of antigenic stimulation on incorporation of phosphate and methionine into proteins of isolated lymph node cells. J. exp. Med. **110**, 207—219 (1959).
Kit, S., and D. M. Greenberg: Tracer studies on the metabolism of the Gardener lymphosarcoma. Energy-yielding reactions and amino acid uptake into protein of the tumor cell. Cancer Res. **11**, 495—499 (1951).
Lettré, H.: Nachtrag zu der Arbeit, Einige Beobachtungen über das Wachstum des Mäuse-Ascites-Tumors und seine Beeinflussung. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **271**, 190 (1941).
— Zellstoffwechsel und Zellteilung. Naturwissenschaften **38**, 490—496 (1951).
— Neuere Ergebnisse der experimentellen Krebsforschung. Strahlentherapie **92**, 5—18 (1953).
— F. K. Hemprich u. B. Spirig: Über das Verhalten von Bestandteilen von Tumorzellen bei der Transplantation. Verhalten der Mitose von Tumorzellen nach der Injektion von Zellbestandteilen der gleichen Tumorart. Z. Krebsforsch. **59**, 64—67 (1953).
—, u. H. Ried: Zum Stoffwechsel der Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Tumors in vitro. Naturwissenschaften **44** (1957).
—, u. A. Schleich: Untersuchungen am Yoshida-Tumor. Naturwissenschaften **41**, 505 (1954).
—, u. H. Wrba: Über das Verhalten von Bestandteilen von Tumorzellen bei der Transplantation. IX. Z. Krebsforsch. **60**, 80—85 (1954).
— — u. E. Seidler: Über das Verhalten von Bestandteilen von Tumorzellen bei der Transplantation. Aufnahme und Verteilung markierter Zellbestandteile in Zellen des Mäuseascitestumors. Z. Krebsforsch. **60**, 294—300 (1955).
Miroff, G., and W. E. Cornatzer: Phosphorus metabolism of a C_3H ascites tumor in vivo. Cancer Res. **18**, 398—403 (1958a).
— — Phosphorus metabolism of a C_3H ascites tumor in vitro. Cancer Res. **18**, 403—410 (1958b).
Morgan, J. F., L. F. Guerin and H. J. Morton: The effect of low temperature an storage on the viability and mouse strain specifity of ascites tumor cells. Cancer Res. **16**, 907—911 (1956).
— H. J. Morton and R. C. Parker: Nutrion of animal cells in tissue culture. Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **73**, 1—8 (1950).
Nicholas, J. S.: Embryonic rat tissue survival. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **29**, 188 (1931).
Olson, R. E.: Oxidation of C^{14}-labeled carbohydrate intermediates in tumor and normal tissue. Cancer Res. **11**, 571—584 (1951).
Pannett, C. A., and A. Compton: The cultivation of tissues in saline embryonic juice. Lancet **1924 I**, 206, 381.
Parkes, A. S.: Viability of ovarian tissue after freezing. Proc. roy. Soc. B **17**, 520—528 (I957).

Pulver, R., B. Exer u. B. Herrmann: Über die Beeinflussung enzymatischer Reaktionen durch Phenylbutazon und die Übertragbarkeit fermentchemischer Befunde auf die Stoffwechselprozesse der Zelle. Schweiz. med. Wschr. **1956**, 1080—1085.

Rabinovitz, M., M. E. Olson and D. M. Greenberg: Relation of energy processes to the incorporation of amino acids into proteins of the Ehrlich ascites carcinoma. J. biol. Chem. **211**, 1—9 (1954).

Rechenberg, H. K.: Phenylbutazon, Butazolidin, unter besonderer Berücksichtigung der Nebenwirkungen. Stuttgart: Georg Thieme 1957.

Roka, L.: Vermutungen über die Entstehung des Lebens in: Vergleichend biochemische Fragen. Berlin: Springer 1956.

Sanford, K. K., W. R. Earle and G. D. Likely: The growth in vitro of single isolated tissue cells. J. nat. Concer Inst. **9**, 229—246 (1948/49).

— G. D. Likely and W. R. Earle: Development of variations in transplantability and morphology within clone of mouse fibroblasts transformed to sarcoma producing cells in vitro. J. nat. Cancer Inst. **15**, 215—237 (1954).

Schleich, A., u. H. Wrba: Anwendung von mit ^{32}P-markierten Tumorzellen zur Bestimmung ihrer Teilungsgeschwindigkeit. Z. Krebsforsch. **59**, 543—545 (1953).

Schrek, R. A.: A method for counting the viable cells in normal and malignant cell suspensions. Amer. J. Cancer **28**, 389—392 (1936).

Seelich, F., W. Weigert u. K. Letnansky: Über die endogene Atmung von Ehrlich-Ascitestumorzellen und deren Beeinflussung durch Glucose und Fructose. Z. Krebsforsch. **61**, 368—375 (1956).

Siekevitz, P., and V. R. Potter: Effect of 2,4-dinitrophenol and of fluorideon in normal an tumor tissues. Cancer Res. **13**, 513—520 (1953).

Smith, A. U.: The use of glycerol for the preservation of living cells at low temperature. Proc. roy. Soc. Med. **47**, 57—60 (1954).

Ten Cate, G.: The biochemical an structural basis of morphogenesis. Arch. néerl. Zool. **10**, Suppl., 1 (1954).

Thomas, C. G., and E. A. Wilson: The uptake of P^{32} as a measure of cellular metabolism in the human thyroid. J. Endocr. and Metabolism **19**, 306—316 (1959).

Thumm, W.: Kann Trypanblauspeicherung zur Bestimmung der Vitalität von Tumorzellen dienen? Z. Krebsforsch. **60**, 91—93 (1954).

Warburg, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Springer 1926.

Weinhouse, S.: Oxidative metabolism of neoplastic tissues. Advanc. Cancer Res. **3**, 269—325 (1955).

Wenner, C. E., and S. Weinhouse: Metabolism of neoplastic tissue. III. Diphosphopyridin nucleotide requirements for oxidations by mitochondria of neoplastic and nonneoplastic tissues. Cancer Res. **13**, 21—26 (1953).

Wenner, C., and S. Weinhouse: Metabolism of neoplastic tissue. IX. An isotope tracer study of glucose catabolism pathways in normal and neoplastic tissues. J. biol. Chem. **222**, 399—414 (1956).

Wiseman, G., and F. N. Ghadially: Studies in amino-acid uptake by RD 3 sarcoma cell suspensions in vitro. Brit. J. Cancer **9**, 480—485 (1955).

Wrba, H.: Notiz über die Überlebenszeit der Zellen des Mäuseascitestumors in vitro unter anaeroben Bedingungen. Z. Krebsforsch. **59**, 495 (1953).

— Vergleichende Stoffwechseluntersuchungen an normalen und Tumorzellen. Verh. der Dtsch. Ges. Path., 42. Tagg, 1958, S. 435—439.

— Über wechselweise auf Ratten und Mäusen wachsende Tumorlinien in Ascitesform. Klin. Wschr. **37**, 773 (1959).

— Wachstum des Yoshida-Sarkoms der Ratte auf unbehandelten Mäusen. Klin. Wschr. **38**, 327 (1960a).

— Die Wirkung von Glucose auf die Aufnahme von hochmolekularen Partikeln durch Tumorzellen in vitro. Z. Krebsforsch. **63**, 415—422 (1960).

—, u. G. Giessler: Zur Aufnahme von Bestandteilen von Tumorzellen. Naturwissenschaften **45**, 192 (1958).

Wrba, H. u. H. Kalb: Vergleich des Phosphatumsatzes embryonaler und adulter Organe in vitro. Naturwissenschaften **46**, 405 (1959a).
— — Eine Methode der Roller-Röhrchen-Kultur für die quantitative Untersuchung des Stoffumsatzes in vitro. Naturwissenschaften **46**, 78 (1959b).
— — Die spezifische Stoffwechselwirkung eines in der Placenta enthaltenen Faktors in vitro. Naturwissenschaften **47**, 85—86 (1960).
—, u. M. Ripoll-Gòmez: Die cytologische Analyse des spontan heterotransplantablen Stammes MR—RM des Walker-Tumors in Ascitesform. Z. Krebsforsch. **63**, 439—446 (1960).
— — u. H. Ranz: Zum Nachweis eines humoralen „Regenerationsfaktors" im Serum partiell hepatektomierter Ratten. Naturwissenschaften **47**, 182 (1960).
— — — Die stoffwechselsteigernde Wirkung des Serums hepatektomierter Ratten auf Leberkulturen. Exp. Cell Res. **20**, 232—235 (1960).
Zamecnik, P.: Relations between glycolysis and incorporation of amino acids into protein in Yoshida sarcoma. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **1**, 63 (1953).
Zamecnik, P. C., and M. L. Stephenson: Studies on crossconnections between carbohydrate and protein metabolism in the rat hepatoma. Cancer Res. **10**, 251 (1950).
Zitcer, E. M., and T. H. Dunnebacke: Transformation of cells from normal human amnion into established strains. Cancer Res. **17**, 1047—1053 (1957).

Dr. Heinrich Wrba, Pathologisches Institut der Universität München 15, Thalkirchner Straße 36

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung *und* Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Vor kurzem erschien:

Stammesgeschichte der Säugetiere

Eine Übersicht über Tatsachen und Probleme der Evolution der Säugetiere

Von Professor Dr. Erich Thenius,
Paläontologisches Institut der Universität Wien,
und Professor Dr. Helmut Hofer,
Max Planck-Institut für Hirnforschung, Gießen

Mit 53 Abbildungen und 2 Tabellen. VI, 322 Seiten Gr.-8°. 1960. Ganzleinen DM 79,—

INHALTSÜBERSICHT

Allgemeiner Teil: Grundsätzliches zur stammesgeschichtlichen Forschung (Hofer). Fossilisation und Biostratinomie; die Lückenhaftigkeit der Fossilüberlieferung (Thenius und Hofer). Relative und absolute Chronologie (Thenius). Paläogeographie der Kontinente im Kaenozoikum (Thenius). Probleme des Aussterbens (Thenius und Hofer) · Morphologisch-anatomischer Teil: Grundzüge der Gebißmorphologie (Thenius). Ursprung der Säugetiere und ihre anatomische Kennzeichnung (Hofer und Thenius). Paläoneurologie (Hofer) · Systematischer Teil: Die mesozoischen Säugetiere und ihre stammesgeschichtliche Bedeutung (Thenius). Die Prototheria (Kloakentiere oder Monotremata) (Thenius). Die Metatheria (Beuteltiere oder Marsupialia) (Thenius). Die Eutheria (Monodelphia oder Placentalia) (Thenius und Hofer). Die Haussäugetiere und ihre Abstammung (Hofer und Thenius). Die Entwicklung der Säugetierfaunen auf den einzelnen Kontinenten (Thenius) · Literaturverzeichnis · Namen- und Sachverzeichnis.

ZUR INFORMATION

Das Buch gibt eine Übersicht über die Stammesgeschichte der Säugetiere, deren Kenntnis in den letzten Jahrzehnten durch Fossilfunde und vergleichend-anatomische Untersuchungen an rezenten Formen sich wesentlich erweitert hat. Da die Säugetiere ihre Blüte erst in der Erdneuzeit (Kaenozoikum) erlebten, sind sie jene Tiergruppe, deren Phylogenie gegenwärtig durch Fossilfunde am besten belegt ist. Dies und das Fehlen einer modernen zusammenfassenden Darstellung führte zur Abfassung des Buches. Besonderer Wert wurde auf Illustrationen gelegt, indem zahlreiche — durchweg neu entworfene — Stammbäume die stammesgeschichtlichen Zusammenhänge und damit den gegenwärtigen Stand unserer Kenntnis zum Ausdruck bringen sollen.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany